

Intelligente Drug-Delivery-Systeme zur Vermeidung Implantat-assoziiierter Infektionen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christian Tolle

aus Wernigerode

1. Referent:	Professor Dr. Henning Menzel
2. Referent:	Professor Dr. Adrian Schumpe
eingereicht am:	26.06.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am.	15.09.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

B. Rais, M. I. Rahim, S. Lienenklaus, S. Weiss, C. Tolle, J.-M. Seitz, H. Menzel, H. Hauser, P. P. Müller, *Animal Test Models for Implant-Associated Inflammation and Infections in Biomedical Technology*, Springer, 2014.

Tagungsbeiträge – Vorträge

C. Tolle, J. Riedel, D. Wirth, H. Menzel: Smart Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, European Society for Biomaterials, Krakau/Polen, August 2015.

C. Tolle, J. Riedel, K. Haak: Polymers and Biology – A promising Alliance, Annual Retreat, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Juni 2015

Tagungsbeiträge – Poster

C. Tolle, J. Riedel, D. Wirth, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, Christmas Symposium, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Dezember 2015.

C. Tolle, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, European Polymer Federation (EPF), Dresden, Juni 2015.

C. Tolle, J. Riedel, D. Wirth, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, GDCH Jungchemikerforum, Braunschweig, April 2015.

C. Tolle, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, Makromolekulares Kolloquium, Freiburg, Februar 2015.

C. Tolle, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, Christmas Symposium, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Dezember 2014.

C. Tolle, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, Advanced Materials for Biomedical Applications (AMBA), Gent/Belgien, November 2014.

C. Tolle, H. Menzel: Polymer Nanoparticles for Triggered Drug Releases, Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien, Dresden, November 2014.

C. Tolle, N. Poth, H. Menzel: Biopolymer nanoparticles for protein drug delivery, Annual Retreat, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Mai 2014.

C. Tolle, H. Menzel: Alginate – Peptide nanoparticles for the drug delivery of proteins, Christmas Symposium, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Dezember 2013.

C. Tolle, N. Poth, H. Menzel: Polymer nanoparticles for Infection triggered Drug Releases, Annual Retreat, Grad School Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Juni 2013.

Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

- Herrn *Prof. Dr. Henning Menzel* für die Überlassung des interdisziplinären Themas, die Unterstützung und das durch Anregungen und Diskussionen gezeigte Interesse an dieser Arbeit.
- Herrn *Prof. Dr. Adrian Schumpe* für die Übernahme des Korreferats.
- dem Thesis Committee, bestehend aus Frau *Prof. Dr. Dagmar Wirth* und Herrn *Prof. Dr. Philip Tinnefeld*, für das regelmäßige Feedback.
- Herrn *Jan Riedel (M.Sc.)* (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung HZI, Braunschweig) für die Zusammenarbeit an der Freisetzung von Interferon- β .
- Frau *Carina Brickwedde (M.Sc.)* und Herrn *Dr. Andreas Winkel* (Medizinische Hochschule Hannover MHH) für die Durchführung der Zellkompatibilitätsexperimente.
- Frau *Dr. Susanne Boye* (Institut für Polymerforschung IPF, Dresden) für die Durchführung der AFFFF-Experimente.
- Frau *Dr. Britte Tiersch* (Institut für Kolloidchemie, Universität Potsdam) für die Kryorasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.
- Herrn *Dr. Rolf Nitzsche* (MALVERN INSTRUMENTS) für die Nanoparticle Tracking Analysis.
- Herrn *Peter Pfeiffer* (Institut für Werkstoffkunde, TU Braunschweig) für die REM-Untersuchungen.
- Frau *Dr. Wibke Dempwolf* für die Vermittlung der XPS- und ToF-SIMS-Analysen sowie das Korrekturlesen.
- Frau *Katharina Haak (M.Sc.)* für die Übernahme des Korrekturlesens.
- allen jetzigen und ehemaligen Kollegen des Arbeitskreises Menzel für die Zusammenarbeit und zahlreiche, in guter Erinnerung bleibende Spieleabende und Ausflüge.
- Frau *Manja Paul* für ihre Liebe und ihre mentale Unterstützung in schwierigen Stunden.
- meinen Eltern, Frau *Christine* und Herrn *Lothar Tolle*, sowie meiner Großmutter *Else Tolle* für den fortwährenden finanziellen Rückhalt während der letzten zehn Jahre.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2.	Aufgabenstellung.....	5
3.	Drug-Delivery-Systeme	6
3.1	Varianten von Drug-Delivery-Systemen	6
3.1.1	Mizellen	7
3.1.2	Liposome	8
3.1.3	Hydrogele	9
3.1.4	Nanopartikel	10
3.1.5	Dendrimere	12
3.2	Stimuli-responsive Drug-Delivery-Systeme	13
3.2.1	pH-responsive Drug Delivery Systeme	13
3.2.2	Temperatur-responsive Drug Delivery Systeme.....	16
3.2.3	Redox-responsive Drug Delivery Systeme.....	17
3.2.4	Enzym-responsive Drug Delivery Systeme	20
3.2.5	Physikalische Stimuli.....	22
3.2.6	Dual-responsive Nanocarrier.....	22
3.3	Lösungsansatz.....	26
4.	Biopolymer-Nanopartikel	28
4.1	Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel.....	28
4.1.1	Chitosan.....	29
4.1.2	Natriumtripolyphosphat.....	30
4.2	Alginat/Peptid-Nanopartikel	31
4.2.1	Alginat.....	31
4.2.2	α -Poly-L-Lysin (α PLL).....	32
4.2.3	NITEGE/NVTEGE	33
4.2.4	Aggrecanase	35
4.3	Interferon- β (IFN β)	37
4.4	“enhanced green fluorescent protein” (eGFP).....	39
5.	Grundlagen der Analytik.....	41
5.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	41
5.1.1	Aufbau: Zetasizer Nano ZS.....	42
5.1.2	Bestimmung der Partikelgröße.....	43
5.1.3	Bestimmung des Zetapotentials.....	46
5.1.4	Messprinzip des Zetapotentials.....	47

5.2	Ellipsometrie.....	49
5.3	Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS)	51
5.4	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	52
5.5	Quarzkristallmikrowaage (QCM-D)	55
6.	Ergebnisse.....	57
6.1	Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel.....	57
6.1.1	Partikelcharakterisierung	57
6.1.2	Beschichtungen	62
6.1.3	Einlagerungsstudien mit IFN β	71
6.1.4	Freisetzungsstudien aus CS-58/IFN β /TPP-Beschichtungen.....	75
6.1.5	Einlagerungs- und Freisetzungsstudien mit eGFP	79
6.1.6	Zelltests.....	85
6.1.7	Zusammenfassung.....	92
6.2	Modifikation des Chitosan-Tripolyphosphat-Systems	94
6.2.1	Thiol-En-Clickchemie	94
6.2.2	Verwendung als TPP-Ersatz	107
6.2.3	Chitosanazid-Tripolyphosphat-Nanopartikel	108
6.2.4	Zusammenfassung.....	119
6.3	Alginate/Peptid-Nanopartikel	121
6.3.1	Charakterisierung von Natriumalginate	121
6.3.2	Charakterisierung von Alg/ α PLL-Nanopartikeln.....	123
6.3.3	Charakterisierung von Alg/NI(V)TEGE-Nanopartikeln.....	132
6.3.4	Alg/Peptid-Nanopartikel als Beschichtung auf Titan.....	139
6.3.5	Einlagerungsexperimente von IFN β in Alg/NITEGE-Nanopartikel.....	153
6.3.6	Freisetzungsstudien aus Alg/IFN β /NVTEGE-Beschichtungen.....	155
6.3.7	Einlagerungs- und Freisetzungsstudien mit eGFP	158
6.3.8	Zelltests.....	162
6.3.9	RGD-Alginate	167
6.3.10	Zusammenfassung.....	174
7.	Zusammenfassung und Ausblick	177
8.	Experimenteller Teil	181
8.1	Materialien	181
8.1.1	verwendete Chemikalien.....	181
8.1.2	verwendete Lösungsmittel.....	183
8.1.3	Titansubstrate.....	183

8.2	Polymercharakterisierung	184
8.2.1	NMR-Spektroskopie.....	184
8.2.2	FTIR-Spektroskopie.....	184
8.2.3	Elementaranalyse (EA)	184
8.2.4	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	184
8.3	Nanopartikelcharakterisierung.....	185
8.3.1	Partikelgröße	185
8.3.2	Zetapotential	185
8.3.3	Kryo-REM.....	185
8.3.4	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)	185
8.4	Beschichtungsmethode und –charakterisierung.....	186
8.4.1	Tauchbeschichtung von PEI.....	186
8.4.2	Sprühbeschichtung der Titansubstrate	186
8.4.3	Sprühbeschichtung der Siliziumplättchen.....	186
8.4.4	Ellipsometrie.....	187
8.4.5	Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS)	187
8.4.6	Quarz-Kristallmikrowaage (QCM).....	187
8.4.7	REM	188
8.4.8	XPS.....	188
8.4.9	ToF-SIMS.....	188
8.4.10	SEEC	188
8.5	CS-83/TPP-Nanopartikel.....	188
8.5.1	Aufreinigung von Chitosan (CS-83).....	188
8.5.2	Herstellung von CS-72 durch Acetylierung von CS-83.....	189
8.5.3	Herstellung von CS-58 durch Acetylierung von CS-83.....	190
8.5.4	Präparation von CS/TPP-Nanopartikeln	190
8.5.5	Stabilität der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen	191
8.5.6	Degradation der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen.....	191
8.5.7	Beschichtung von Titansubstraten mit CS/TPP-Nanopartikeln.....	191
8.5.8	Stabilität der CS/TPP-Beschichtungen.....	191
8.5.9	Einkapselung von IFN β in CS/TPP-Nanopartikel.....	192
8.5.10	Freisetzung von IFN β aus CS/TPP-Nanopartikeln.....	192
8.5.11	Einkapselung von eGFP in CS/TPP-Nanopartikel.....	192
8.5.12	Freisetzung von eGFP aus CS/TPP-Beschichtungen	193
8.6	Alginat-Peptid-Nanopartikel.....	193

8.6.1	Aufreinigung von Alginat	193
8.6.2	Präparation von Alginat/ α PLL-Nanopartikeln	195
8.6.3	Präparation von Alginat/NITEGE- und Alginat/NVTEGE-Nanopartikeln	195
8.6.4	Stabilität der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen	195
8.6.5	Degradation der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen	195
8.6.6	Beschichtung von Titansubstraten mit Alginat/Peptid-Nanopartikeln	196
8.6.7	Stabilität der Alginat/Peptid-Beschichtungen	196
8.6.8	Einkapselung von IFN β in Alginat/NVTEGE-Nanopartikel	196
8.6.9	Freisetzung von IFN β aus Alginat/Peptid-Nanopartikeln	196
8.6.10	Freisetzung von eGFP aus Alginat/Peptid-Nanopartikeln	197
8.6.11	Freisetzung von eGFP aus Alginat/Peptid-Beschichtungen	197
8.7	Zellkompatibilitätstests	198
8.7.1	CellTiterBlue- und LDH-Assay der Nanopartikelsuspensionen	198
8.7.2	LDH-Assay der Nanopartikelbeschichtungen	198
8.8	Thiol-En-Synthesen	199
8.8.1	UV-Vernetzung	199
8.8.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	199
8.8.3	Säulenchromatographie	200
8.8.4	NMR-Spektroskopie	200
8.8.5	Elementaranalyse	200
8.8.6	FTIR-Spektroskopie	200
8.8.7	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)	200
8.8.8	Synthesevorschriften	201
8.9	ChitosanAzid-Synthese	205
8.10	sRGD-Alginat	206
9.	Literaturverzeichnis	208
10.	Anhang	217
10.1	REM-Aufnahmen	223
10.2	^1H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR-Spektren	225
10.3	FTIR-Spektren	237
10.4	ESI-Massenspektrometrie	242

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1—1	Entstehung eines Biofilms auf einer Substratoberfläche.	2
Abbildung 3—1	Schematische Darstellung einer Standardmizelle	8
Abbildung 3—2	Schematische Darstellung eines Liposoms mit Membrandoppelschicht.	8
Abbildung 3—3	Schematische Darstellung eines Hydrogels.	9
Abbildung 3—4	Schematische Darstellung einer A) Nanokapsel und einer B) Nanosphäre.	11
Abbildung 3—5	Schematische Darstellung eines Dendrimers.	12
Abbildung 3—6	Reversible oxidative Bildung des Disulfids GSSG.	18
Abbildung 4—1	Strukturformel von Chitosan	29
Abbildung 4—2	Strukturformel von Natriumtripolyphosphat	30
Abbildung 4—3	Strukturformel von Alginat	31
Abbildung 4—4	Strukturformel von α -Poly-L-Lysin Hydrochlorid.	33
Abbildung 4—5	Aminosäuresequenz der Aggrecanase-labilen Crosslinker	33
Abbildung 4—6	Spaltstellen für Thermolysin und Trypsin anhand NITEGE↓ARGSV.	35
Abbildung 4—7	Schematische Darstellung der Struktur des Aggrecans.	35
Abbildung 4—8	Schematische Darstellung der Expression von IFN β infolge einer Virusinfektion.	38
Abbildung 4—9	IFN-Antwort <i>in vivo</i> anhand von Mx2Luc-Reporter-Mäusen	39
Abbildung 5—1	Partikelgrößenverteilung einer Suspension mit einem hohen PDI.	42
Abbildung 5—2	Strahlengang des Zetasizer Nano ZS von Malvern	43
Abbildung 5—3	ntensitätsverteilung von A) größeren und B) kleineren Partikeln.	44
Abbildung 5—4	Autokorrelationsfunktion einer dynamischen Lichtstreuung	45
Abbildung 5—5	Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht.	47
Abbildung 5—6	Frequenzverschiebung des Laserlichts an a) einem starren Partikel und b) an einem bewegten Partikel.	48
Abbildung 5—7	Henry-Funktion der a) SMOLUCHOWSKI- und b) HÜCKEL-Näherung.	49
Abbildung 5—8	Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.	50
Abbildung 5—9	Schematischer Aufbau eines RAIRS-Experiments.	52
Abbildung 5—10	Schematische Darstellung der Photoemission	53
Abbildung 5—11	Vergleich der Frequenz- und Dissipationsänderungen bei a) starren und b) weichen Filmen auf der Substratoberfläche.	56
Abbildung 6—1	Partikelgrößenmessung der CS/TPP-Formulierungen.	59
Abbildung 6—2	Kryo-REM-Aufnahmen der CS-83/TPP- und der CS-58/TPP-Formulierungen.	60
Abbildung 6—3	Zetapotentialmessung der CS/TPP-Formulierungen	61
Abbildung 6—4	Degradation der CS/TPP-Formulierungen in Gegenwart von Lysozym.	62

Abbildung 6—5	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der CS/TPP-Beschichtungen	63
Abbildung 6—6	Pseudo-colorierte Hellfeldaufnahme der CS-83/TPP-Beschichtung mittels SEEC	64
Abbildung 6—7	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Evaluierung der Stabilität der CS/TPP-Beschichtungen in Gegenwart von Lysozym	66
Abbildung 6—8	QCM-Messung von CS-83/TPP	67
Abbildung 6—9	QCM-Messung von CS-58/TPP	69
Abbildung 6—10	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Evaluierung der Stabilität von CS/TPP-Beschichtungen in Zellkulturmedien	70
Abbildung 6—11	Vergleich von CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Nanopartikeln mit <i>nicht-kommerziellem</i> IFN β	72
Abbildung 6—12	Intensitätsverteilungen von a) CS-58/TPP-Nanopartikeln, b) <i>nicht-kommerziellem</i> IFN β (10700 U/mL) und c) CS-58/TPP-Partikeln mit <i>nicht-kommerziellem</i> IFN β ..	73
Abbildung 6—13	Fold-Induction von CS-58/IFN β /TPP in DMEM/10 % FBS; DMEM und PBS	76
Abbildung 6—14	Fold-Induction von CS-58/IFN β /TPP in PBS mit und ohne Lysozym.....	77
Abbildung 6—15	Fold-Induction von CS-58/IFN β /TPP in H ₂ O mit und ohne Lysozym	78
Abbildung 6—16	Fold-Induction von CS-83/IFN β /TPP mit und ohne Zugabe von Lysozym.....	79
Abbildung 6—17	Fluoreszenz der CS/eGFP/TPP-Formulierungen mit und ohne Zentrifugation	81
Abbildung 6—18	a) Konzentrationsreihe von eGFP bei verschiedenen Zeitpunkten. b) Fluoreszenz von CS/eGFP/TPP-Beschichtungen.....	83
Abbildung 6—19	CellTiterblue-Test der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen	86
Abbildung 6—20	LDH-Test der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen	87
Abbildung 6—21	LDH-Test von CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen.....	89
Abbildung 6—22	REM des LDH-Tests der CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen.....	90
Abbildung 6—23	LDH-Test von CS-72/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen.....	91
Abbildung 6—24	REM des LDH-Tests der CS-72TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen	92
Abbildung 6—25	FTIR-Spektren von mono- und disubstituierten 3a und 5a	96
Abbildung 6—26	¹ H-NMR-Spektren von 3a und des Hydrolyseprodukts 4a	97
Abbildung 6—27	FTIR-Spektren von mono- und disubstituierten 5b und 3b	99
Abbildung 6—28	¹ H-NMR-Spektren von 3b und des Hydrolyseprodukts 4b	100
Abbildung 6—29	Strukturformel von Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) 6	100
Abbildung 6—30	¹ H-NMR-Spektren der Produkte der Thiol-En-Reaktion von 1 mit 6	101
Abbildung 6—31	Mögliche Produkte der Reaktion von 1 und 6	102
Abbildung 6—32	IR-Spektren der Produkte der Thiol-En-Reaktion von 1 und 6	103
Abbildung 6—33	Partikelgrößenverteilungen der CSAzid/TPP-Formulierungen vor und nach der Belichtung bei 290 nm.....	111

Abbildung 6—34	Stabilitätsuntersuchungen der CSAzid/TPP-Formulierungen mit und ohne Lysozym	112
Abbildung 6—35	RAIRS der CSAzid/TPP-Beschichtungen vor und nach der Belichtung	114
Abbildung 6—36	Inkubation von CS/TPP- und CSAzid/TPP-Beschichtungen in Gegenwart von Lysozym	116
Abbildung 6—37	Einfluss der UV-Belichtung auf die Aktivität von IFN β in Gegenwart der CSAzid-30/TPP und CS-58/TPP-Nanopartikel	117
Abbildung 6—38	IFN β -Freisetzung aus vernetzten und unvernetzten CSAzid-30/IFN β /TPP-Beschichtungen	118
Abbildung 6—39	^1H -NMR-Spektren von Natriumalginat	122
Abbildung 6—40	Chromatogramm der GPC-Messung von Natriumalginat	123
Abbildung 6—41	Partikelgrößenverteilung von Alg/ α PLL bei verschiedenen pH-Werten	125
Abbildung 6—42	Ergebnisse der NTA-Messungen von Alg/ α PLL.....	126
Abbildung 6—43	Kryo-REM-Aufnahmen der Alg/ α PLL-Nanopartikel	127
Abbildung 6—44	Zetapotential von Alg/ α PLL bei verschiedenen pH-Werten.....	129
Abbildung 6—45	Stabilitätsuntersuchungen der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen.....	132
Abbildung 6—46	Partikelgrößenverteilung der Alg/NITEGE- und Alg/NVTEGE-Nanopartikel.....	134
Abbildung 6—47	Zetapotential der Alg/NITEGE- und Alg/NVTEGE-Nanopartikel in Reinstwasser	135
Abbildung 6—48	Ergebnisse der NTA-Messungen von Alg/NITEGE.	136
Abbildung 6—49	Kryo-REM-Aufnahmen der Alg/NITEGE-Nanopartikel in Reinstwasser.....	137
Abbildung 6—50	Stabilitätsuntersuchungen der Alg/NITEGE-Nanopartikelsuspensionen	139
Abbildung 6—51	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Alg/ α PLL- und der Alg/NITEGE-Beschichtung.....	140
Abbildung 6—52	RAIRS-Spektren der Alg/ α PLL-Nanopartikel	141
Abbildung 6—53	RAIRS-Spektren der Alg/NITEGE-Nanopartikel.	142
Abbildung 6—54	REM einer teilbeschichteten Alg/ α PLL-Probe auf TiAl6V4	143
Abbildung 6—55	REM der beschichteten Seite einer Alg/ α PLL-Probe auf TiAl6V4.....	143
Abbildung 6—56	REM einer teilbeschichteten Alg/NITEGE-Probe auf TiAl6V4.....	144
Abbildung 6—57	REM der beschichteten Seite einer Alg/NITEGE-Probe auf TiAl6V4.	145
Abbildung 6—58	Atomare Oberflächenzusammensetzung der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Beschichtungen mittels XPS	146
Abbildung 6—59	Quadranten für ToF-SIMS-Untersuchungen der Alg/Peptid-Beschichtungen	147
Abbildung 6—60	ToF-SIMS-Spektren der Quadranten a) I und b) II	148
Abbildung 6—61	ToF-SIMS-Spektrum des Quadranten III	149

Abbildung 6—62	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenänderung von Alg/ α PLL-Beschichtungen in Gegenwart von Trypsin, Thermolysin und Alg-Lyase	151
Abbildung 6—63	QCM-Messung von Alg/ α PLL	152
Abbildung 6—64	Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenänderung der Alg/NITEGE-Beschichtungen in Gegenwart von Trypsin, Thermolysin und Alg-Lyase	153
Abbildung 6—65	Intensitätsverteilung von Alginat/NITEGE-Partikeln mit <i>kommerziellem IFNβ</i> ...	155
Abbildung 6—66	Fold-Induction von Alg/IFN β /NITEGE- in DMEM/10 % FBS; DMEM und PBS.	156
Abbildung 6—67	Fluoreszenz der Alg/eGFP/Peptid-Formulierungen mit/ohne Zentrifugation	159
Abbildung 6—68	a) Konzentrationsreihe von eGFP bei verschiedenen Zeitpunkten. b) Fluoreszenz von Alg/eGFP/Peptid-Beschichtungen.	161
Abbildung 6—69	CellTiter-Blue-Assay der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Nanopartikelsuspensionen	163
Abbildung 6—70	LDH-Test der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Nanopartikelsuspensionen.....	164
Abbildung 6—71	LDH-Test der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Beschichtungen	166
Abbildung 6—72	REM des LDH-Tests der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Beschichtungen.....	167
Abbildung 6—73	Partikelgrößenmessungen der RGD-Alginat/ α PLL-Formulierungen.	171
Abbildung 6—74	LDH-Tests der RGD/ α PLL-Beschichtungen.	172
Abbildung 6—75	REM des LDH-Tests der cRGD / α PLL- und sRGD/ α PLL-Beschichtungen.....	174

Reaktionsschemataverzeichnis

Reaktionsschema 4-1	Bildung des Fluorophors bei dem „green fluorescent protein“ (GFP)	40
Reaktionsschema 6-1	Acetylierung von CS-83 mit Essigsäureanhydrid zu CS-58 und CS-72.....	58
Reaktionsschema 6-2	Überblick über Thiol-En-Reaktionen.....	104
Reaktionsschema 6-3	Hydrolysereaktion von 3a oder 3b zu Phosphonsäure 4a und 4b.....	104
Reaktionsschema 6-4	Thiol-En-Reaktion von 1 mit 2a zu 5a und 3a	104
Reaktionsschema 6-5	Hydrolyse von 3a zum Natriumsalz 4a	105
Reaktionsschema 6-6	Thiol-En-Reaktion von 1 mit 2b zu 5b und 3b	105
Reaktionsschema 6-7	Hydrolyse von 3b zum Natriumsalz 4b	105
Reaktionsschema 6-8	Hydrolyse von 10 zum Natriumsalz 11	106
Reaktionsschema 6-9	Photovernetzung von Arylazidogruppen mit Chitosan.....	109
Reaktionsschema 6-10	EDC-initiierte Kupplung von Alginat mit Octadecylamin zu Alg-ODA.....	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 6-1	Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat 1 mit 2a	96
Tabelle 6-2	Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat 1 mit 2b	98
Tabelle 6-3	Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat 1 und 6	102
Tabelle 6-4	UV-initiierte Amidkupplung von 4-Azidobenzosäure mit CS-58	110
Tabelle 6-5	Vergleich der Partikelgrößen von Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen mit DLS, NTA, AFFFF und Kryo-REM.	128
Tabelle 6-6	Partikelgröße und Zetapotential für Alginat/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen unter Zugabe der PBS-Salze.	130
Tabelle 6-7	XPS-Ergebnisse von Alg/ α PLL und Alg/NITEGE-Beschichtungen.....	147
Tabelle 6-8	Vergleich zwischen kommerziellem RGD-Alginat (cRGD) und der drei synthetisierten RGD-Alginate (sRGD)	169
Tabelle 8-1	Chemikalien	181
Tabelle 8-2	Lösungsmittel	183
Tabelle 8-3	Zusammensetzung des Natriumalginats durch ^1H -NMR-Spektroskopie.....	194
Tabelle 8-4	Amidkupplung von Natrium-4-Azidobenzoat mit Chitosan-58.	206
Tabelle 8-5	Amidkupplung von GRGDS-Sequenz an Natriumalginat.	206

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

AcOH	-	Essigsäure
α PLL	-	α -Poly-L-Lysin
AAM	-	Acrylamid
ADAMTS	-	Aggrecanase (<u>a</u> <u>d</u> isintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloproteinase with <u>t</u> hrombospondin <u>m</u> otifs)
ADEP	-	Allyldiethylphosphonat
ADP	-	Adenosindiphosphat
AFFFF	-	Asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung
APD	-	Lawinenphotodioden (<u>a</u> valance <u>p</u> hotod <u>i</u> ode)
APM	-	N-3-Aminopropylmethacrylamid
ATP	-	Adenosintriphosphat
BMP-2	-	bone morphogenetic protein 2
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CDCl ₃	-	deutერიertes Chloroform
ChS	-	Chondroitinsulfat
CMC	-	kritische Mizellbildungskonzentration (<u>c</u> ritical <u>m</u> icelle <u>c</u> oncentration)
cRGD	-	kommerzielles RGD-Alginat (<u>c</u> ommercial)
CS	-	Chitosan
CS-58	-	Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 58 %
CS-72	-	Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 72 %
CS-83	-	Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 83 %
CSAzid-10	-	mit Arylazidogruppen modifiziertes CS-58 (10 % theoretischer DS)
CSAzid-20	-	mit Arylazidogruppen modifiziertes CS-58 (20 % theoretischer DS)
CSAzid-30	-	mit Arylazidogruppen modifiziertes CS-58 (30 % theoretischer DS)
D ₂ O	-	Deutერიertes Wasser (Lösungsmittel der NMR-Spektroskopie)
DDA	-	Deacetylierungsgrad
DDS	-	Drug-Delivery-System
DLS	-	Dynamische Lichtstreuung
DEAP	-	3-Diethylaminopropyl
DMAP	-	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMEM	-	Zellkulturnährmedium (<u>D</u> ULBECCO's <u>m</u> odified <u>e</u> agle <u>m</u> edium)
DMF	-	Dimethylformamid
DMT-MM	-	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DS	-	Substitutionsgrad
DSS	-	3-Trimethylsilyl-1-Propansulfonsäure Natriumsalz (NMR-Referenz)
DTT	-	Dithiothreitol
EA	-	Elementaranalyse

ee	-	Einkapselungseffizienz
EDC	-	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDDT	-	2,2-Ethylendioxydiethanthiol
EPS	-	extrazelluläre polymere Substanzen
ESI	-	Elektrosprayionisation
EtOAc	-	Ethylacetat
EZM	-	extrazelluläre Matrix
FDA	-	Food and Drug Administration
FTIR	-	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
GAG	-	Glykosaminoglykan
GIR	-	Infrarotspektroskopie bei streifendem Einfall (grazing incidence reflection)
GIT	-	Gastrointestinaltrakt
GPC	-	Gelpermeationschromatographie
GSH	-	reduziertes Glutathion
GSSG	-	oxidiertes Glutathion
HDT	-	1,6-Hexandithiol
HZI	-	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IFN β	-	Interferon- β
IGD	-	interglobuläre Domäne
IRRAS	-	Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie
kDa	-	Kilodalton
keV	-	Kiloelektronenvolt
KS	-	Keratansulfat
LCST	-	lower critical solution temperature
LDH	-	Lactatdehydrogenase
MHH	-	Medizinische Hochschule Hannover
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
MTT	-	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mx2Luc2	-	murine Zellkulturlinie mit Luciferasereporter
$\tilde{\nu}$	-	Wellenzahl
NaCl	-	Natriumchlorid
NaOH	-	Natriumhydroxid
NITEGE \downarrow ARGSV	-	Aggrecanase-labile Peptidsequenz (human)
NVTEGE \downarrow ALGSV	-	Aggrecanase-labile Peptidsequenz (murin)
NMR	-	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NTA	-	Nanoparticle Tracking Analysis
ODA	-	Octadecylamin
PBS	-	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)

PCL	-	Polycaprolacton
PCS	-	Photokorrelationsspektroskopie (<u>p</u> hoton <u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy)
pDNA	-	Plasmid-Desoxribonukleinsäure
PEG	-	Polyethylenglykol
PEI	-	Polyethylenimin
PLA	-	Polymilchsäure (<u>p</u> oly <u>l</u> actic <u>a</u> cid)
PLGA	-	Poly(lactid-co-Glykolid)
PNIPAM	-	Poly(<i>N</i> -isopropylamid)
QCM-D	-	Quarzkristallmikrowaage mit Dissipation
RAIRS	-	Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie
REM	-	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	-	Tripeptid aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RLU	-	relative Leuchteinheit (relative light unit)
ROMP	-	ringöffnende Polymerisation
δ	-	chemische Verschiebung (NMR)
SEEC	-	spezielle Mikroskopietechnik (<u>s</u> urface <u>e</u> nhanced <u>e</u> llipsometric <u>c</u> ontrast)
SiO ₂	-	Siliziumdioxid
SPPS	-	Festphasenpeptidsynthese (<u>s</u> olid <u>p</u> hase <u>p</u> eptide <u>s</u> ynthesis)
SPS	-	Anlage zur Trocknung von Lösungsmitteln (<u>s</u> olvent <u>p</u> urification system)
sRGD	-	synthetisiertes RGD-Alginat (<u>s</u> ynthesized)
TiAl6V4	-	Titanlegierung (medizinische Qualität 5)
TEM	-	Transmissionselektronenmikroskopie
TMS	-	Tetramethylsilan
TMSBr	-	Trimethylsilylbromid
ToF-SIMS	-	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie mit (<u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light <u>s</u> econdary <u>i</u> on <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry)
TPP	-	Natriumtripolyphosphat
siRNA	-	small interfering Ribonukleinsäure
VEGF	-	Vaskulärer endothelischer Wachstumsfaktor (<u>v</u> ascularized <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
XPS	-	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (<u>X</u> -ray <u>p</u> hotoelectron <u>s</u> pectroscopy)

Symbolverzeichnis

Dynamische Lichtstreuung

a	-	Partikelradius
d	-	hydrodynamischer Durchmesser
D	-	translatorischer Diffusionskoeffizient
E	-	elektrisches Feld
ε	-	Dielektrizitätskonstante
F	-	Frequenz
$f(\kappa\alpha)$	-	Henry-Funktion
kb	-	Boltzmann-Konstante
κ	-	Debye-Länge
κ^{-1}	-	Dicke der elektrischen Doppelschicht
I	-	Intensität
η	-	dynamische Viskosität
n	-	Brechungsindex
PDI	-	Polydispersitätsindex
q	-	Streulichtvektor
t, τ	-	Messzeiten
T	-	Temperatur
θ	-	Streuwinkel
u	-	elektrophoretische Mobilität
v	-	Partikelgeschwindigkeit
$\Delta\nu$	-	DOPPLER-Shift
ζ	-	Zetapotential

Ellipsometrie

β	-	Filmphasendicke
d	-	Schichtdicke
$\delta_{1,2}$	-	Phasenverschiebung vor und nach der Reflektion
Δ	-	aus Reflektion resultierende Phasenverschiebung
λ	-	Wellenlänge des Lichts
\tilde{n}	-	komplexer Brechungsindex
$N_{1,2,3}$	-	Medium 1,2 oder 3
$\phi_{1,2,3}$	-	Einfalls- bzw. Ausfallswinkel bei der Brechung/Reflektion

Ψ	-	$\tan \Psi$ Veränderung im Amplitudenverhältnis
r	-	Fresnelkoeffizienten
$R^{s;p}$	-	totaler Reflexionskoeffizient der s- oder p-polarisierten Komponente

Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

E_B	-	Bindungsenergie
E_{kin}	-	kinetische Energie
$h\nu$	-	Energie der Röntgenfluoreszenz
ϕ_e	-	Term für die Energie der Neutralisierungselektronen
r_0	-	Radius
V_{HK}	-	elektrische Spannung an den Halbkugeln

Quarzkristallmikrowaage

C_f	-	kristallabhängige Konstante
Δf	-	Frequenzänderung
Δm	-	Massenänderung

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Heutzutage gelten Biomaterialien, also synthetische oder natürliche Werkstoffe zur direkten Interaktion mit lebenden Systemen, als Standard in der medizinischen Technologie.¹ Während der letzten vier Jahrzehnte konnte auf diesem Gebiet ein enormer Fortschritt verzeichnet werden, aus dem letztlich die Entwicklung von Biopolymeren, Titan und rostfreiem Stahl oder Keramiken für medizinische Anwendungen wie Implantate hervorgingen.^{1,2} Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die erwähnten Biomaterialien zu Implantat-assoziierten Infektionen, infolge von Biofilmbildung, neigen.³ Bei diesem Prozess spielen materialspezifische Eigenschaften wie Oberflächenladung,⁴ Rauigkeit,⁵ Hydrophobizität⁶ und das Ausgangsmaterial selbst⁷ eine signifikante Rolle. Durch die Biofilmbildung kommt es häufig zu Komplikationen in der Einheilphase, woraus oftmals die Notwendigkeit von Folgeoperationen erforderlich wird. Die Infektionen werden zumeist von Biofilmen hervorgerufen, welche durch die initiale Ausbildung eines „conditioning films“ erleichtert werden.^{8,9} Dieser Film setzt sich aus Bestandteilen von Körperflüssigkeiten zusammen, umgibt das sterile Implantat und kann als Konsequenz die Eigenschaften der Implantatoberfläche verändern. Auf diese Weise wird gemäß *Abbildung 1* den Bakterien die initiale Adhäsion (1) an das Implantat erheblich erleichtert. Diese Anlagerung kann nur stattfinden, wenn sich der jeweilige Keim nahe genug an der Implantatoberfläche befindet. Für den eigentlichen Adhäsionsprozess können zwei Theorien herangezogen werden. Mit der klassischen DERJAGUIN-LANDAU-VERWEY-OVERBECK-Theorie kann eine Interaktion von Kolloidpartikeln mit einer Oberfläche erklärt werden.³ In den 1970er Jahren wurde dieses System für bakterielle Interaktionen erweitert, indem die Bakterienzelle als lebendes Kolloid betrachtet wurde¹⁰. Die Anlagerung der Bakterien an die Oberfläche wird demnach durch das Gleichgewicht von VAN-DER-WAALS-Kräften und repulsiven oder anziehenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Keim und Substratoberfläche begünstigt.³ Das thermodynamische Modell hingegen beschreibt eine bevorzugte Anlagerung von Mikroorganismen auf einer Substratoberfläche, wenn die freie Adhäsionsenergie ΔG_{adh} kleiner Null ist. Dieses Phänomen kann bei einem Energiegefälle zwischen gelösten Partikeln und einer Implantatoberfläche beobachtet werden. Dieser Ansatz beschreibt beispielsweise auch die bevorzugte Anlagerung von hydrophoben Partikeln auf einem hydrophoben

Substrat.³ Die weiteren Schritte zur Ausbildung eines Biofilms sind schematisch in Abbildung 1—1 dargestellt und werden eingeteilt in:

- initiale Adhäsion (1)
- irreversible Adhäsion (2)
- Reifephase I (3)
- Reifephase II (4)
- Dispersion (5).⁸

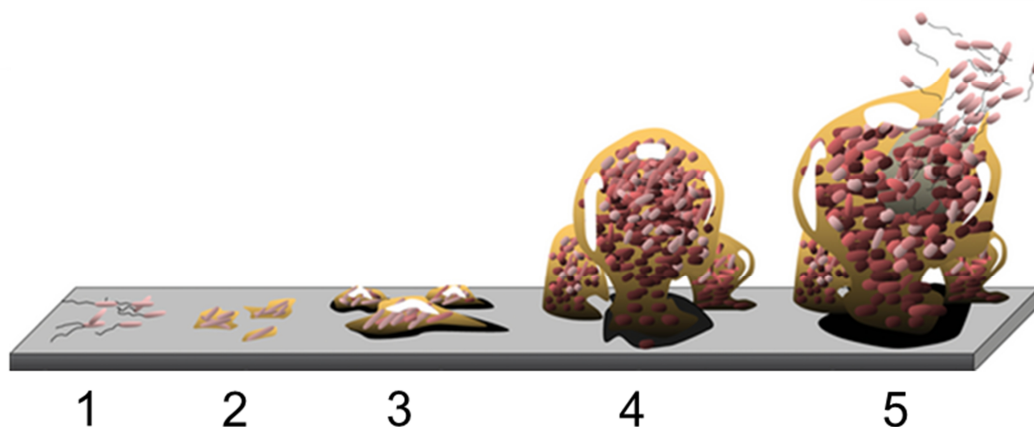


Abbildung 1—1 Entstehung eines Biofilms auf einer Substratoberfläche. Phase 1 – initiale Adhäsion; Phase 2 – irreversible Adhäsion; Phase 3 – Reifung I; Phase 4 – Reifung II und Phase 5 – Dispersion.⁸

Infolge der initialen Adhäsion der Keime kann eine Rezeptor-vermittelte Wechselwirkung von Bakterium und Implantatoberfläche beobachtet werden (2). In dem zuvor erwähnten "conditioning film" befinden sich Rezeptoren, an die in der Folge Mikroorganismen binden können. Am besten untersucht wurde dieses Verhalten für die gram-positiven infektionsrelevanten Pathogene *staphylococcus aureus* (*s. aureus*) und *staphylococcus epidermidis* (*s. epidermidis*). Auf der *s. aureus*-Oberfläche wurden beispielweise „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMM) nachgewiesen, welche an Proteine des „conditioning films“ binden können.¹¹ Zusätzlich dazu wird die Stärke der Adhäsion unter anderem durch Faktoren wie Keimkonzentration, Temperatur, Material und Porosität/Rauigkeit des Substrats beeinflusst.

In den beiden Reifephasen I und II (3 und 4) beginnt die Differenzierung der Bakterien, indem sie ihre genetischen Expressionsmuster verändern, um ihre Überlebenschance zu erhöhen. Dieser Prozess kann als Kommunikation der Keime untereinander verstanden werden und wird in der Literatur als „quorum sensing“ bezeichnet.^{12,13} Anschließend wird

die Sekretion von umhüllenden Matrixsubstanzen eingeleitet, die als extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) bezeichnet werden. Die exakte Zusammensetzung der EPS variiert in Abhängigkeit vom jeweiligen Mikroorganismus. Im Allgemeinen bestehen sie aber aus Polysacchariden, Proteinen, Glykolipiden und bakterieller DNA.¹³ Von lebenden und abgestorbenen Bakterien kann DNA freigesetzt werden, die als relevante strukturelle Komponente in der Biofilmmatrix gilt. Des Weiteren unterstützen die bereits erwähnten Proteine und Enzyme die Verankerung der Biofilme auf der Implantatoberfläche. Im letzten Schritt, der so genannten Dispersionsphase (5), können „reife“ Biofilme Bakterien oder Biofilmfragmente absondern, welche sich wiederum an anderen Stellen anlagern und dort zu einem neuen Biofilm führen können. Die Ausbildung eines Biofilms auf Implantatmaterialien resultiert demnach in einer stabilen Gemeinschaft von Bakterien unterschiedlichster Art. Dadurch wird die Flexibilität der Mikroorganismen gegenüber veränderten Umweltbedingungen erhöht und stellt somit einen evolutionsbedingten Vorteil dar.^{8,13,14}

Um der Entstehung von Biofilmen und einer möglichen nachfolgenden Infektion des Implantats entgegenzuwirken, werden heutzutage verschiedene Strategien verfolgt. VON EIFF unterscheidet in seinem 2005 veröffentlichten Reviewartikel hierbei zwischen nichttechnologischen Maßnahmen wie Sterilität des Implantats oder Handhygiene des Operationsteams auf der einen Seite und Materialmodifikationen auf der anderen Seite.¹⁵ Wie eingangs erläutert, gilt die initiale Adhäsion von Mikroorganismen als wichtigster Schritt bei der Biofilmbildung, aus der eine Implantat-assoziierte Infektion resultieren kann.^{8,13,14} Daher wird die Inhibierung der Keimanlagerung als vielversprechendster Ansatz zur Vermeidung postoperativer Infektionen verstanden.¹⁴ Dafür werden häufig antimikrobielle Oberflächen generiert, indem das jeweilige Implantat mit einer entsprechenden Polymerbeschichtung versehen wird. Für Implantate aus Titan beziehungsweise Titanlegierungen, die vor allem im Zahnersatzbereich und in der Chirurgie Verwendung finden, konnten bereits bakterizide Beschichtungen realisiert werden.^{16,17} Für diesen Ansatz wurden bereits Titansubstrate mit Antibiotika wie Vancomycin oder Gentamicin versehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Biofilmbildung deutlich inhibiert werden konnte.¹⁸ Demgegenüber sollte die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und die zytotoxische Wirkung im Körper selbstredend ständig bedacht werden. Aus diesem Grund wurden vermehrt die Effekte von stark bakteriziden Beschichtungen wie elementarem Silber oder Furanonen untersucht.^{17,19} Es wird vermutet, dass beispielsweise Silberionen von Zellen

aufgenommen werden können, dort die DNA zerstören und durch den Verlust der Replikationsfähigkeit einen Zelltod bewirken können.²⁰ Experimente mit Silbernanopartikelbeschichtungen zeigten zwar eine deutliche Vermeidung von Biofilmen mit pathogenen Bakterien, die hohen Silberkonzentrationen können durch ihre zytotoxischen Effekte jedoch auch eine nachteilige Wirkung haben.²¹ Furanone hingegen besitzen eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den am „quorum sensing“ beteiligten Acyl-Homoserinlactonen, mit den sich die Bakterien innerhalb eines Biofilms verständigen. Dadurch können Furanone an die bakteriellen Rezeptoren der Botenstoffe binden, die Kommunikation unterbrechen und auf diese Weise einer Biofilmbildung entgegen wirken.¹⁹ Ein weiteres Konzept beinhaltet die Beschichtung von antibakteriellen Makromolekülen auf metallischen Implantatoberflächen. Häufig werden Copolymere mit quartären Ammoniumgruppen verwendet, die aufgrund der aus den Ammoniumgruppen resultierenden kationischen Ladungen die Membranen von Mikroorganismen zerstören können.²² Von PFAFFENROTH beispielsweise wurden darüber hinaus biokompatible Titanbeschichtungen auf Basis von Copolymeren mit quartären Ammoniumgruppen vorgestellt, die eine Wirksamkeit gegen einen Biofilm relevanten Keim (*S. mutans*) zeigen.²³ Die vorgestellten Ansätze zur Vermeidung bzw. Verzögerung der Biofilmbildung können jedoch aufgrund des Wirkmechanismus lediglich bei direktem Kontakt zwischen Bakterien und Beschichtung wirken. Daher erscheint eine Freisetzung von Wirkstoffen aus einem Reservoir im Falle von pathogenen Situationen als vielversprechender, selbst dann wenn adsorbierte Proteine oder abgestorbene Bakterien die Implantatoberfläche nicht zugänglich machen.

2. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung enzymatisch-responsiver Wirkstoff-freisetzungssysteme zur Vermeidung Implantat-assoziiierter Infektionen, die häufig aus der Biofilmbildung resultieren. Die Degradation der Materialien soll hierbei als direkte Konsequenz eines Triggers erfolgen, der während Infektions- beziehungsweise Inflammationsreaktionen von pathogenen Bakterien oder als Reaktion auf diese vom Gewebe spezifisch freigesetzt wird. Im Vordergrund der Dissertation steht zunächst a) die Herstellung und Charakterisierung geeigneter Nanocarrier und deren b) Immobilisierung als Drug-Delivery-System auf Implantoberflächen. Weiterhin werden c) die Einkapselung und Freisetzung von Modellwirkstoffen untersucht.

3. Drug-Delivery-Systeme

Die Entwicklung neuer geeigneter Wirkstoffmoleküle ist oft mit hohen Kosten und einem immensen zeitlichen Aufwand verbunden. Daher wird zunehmend auf bereits erforschte Wirkstoffe zurückgegriffen, welche sich durch ihre unzureichende Stabilität und Löslichkeit im menschlichen Organismus oftmals nur schlecht dosieren lassen.²⁴ Ferner werden viele Wirkstoffe natürlicherweise durch Organe wie die Leber kontinuierlich ausgeschieden, was höhere Dosen oder mehrmalige Infusionen notwendig macht. Zudem muss die gezielte Behandlung von Krankheiten in Betracht gezogen werden und folglich beispielsweise nur infektiöses Gewebe therapiert werden.²⁴ Um diesen unerwünschten Nebeneffekten entgegen wirken zu können, werden zunehmend Drug-Delivery-Systeme eingesetzt, die sich im Allgemeinen aus

- der Wirkstoffformulierung,
- dem Medizinprodukt oder der Darreichungsform, um den Wirkstoff in den Organismus zu bringen und zu schützen, sowie
- dem Freisetzungsmechanismus

zusammensetzen. Dabei müssen neben der Konservierung der Aktivität des jeweiligen Wirkstoffs, des Transportes an den beabsichtigten Wirkort und der kontrollierten Freisetzung des Wirkstoffs auch Faktoren wie i) die Einfachheit des Herstellungsprozesses, ii) die Biokompatibilität der eingesetzten Materialien, iii) die Stabilität hinsichtlich sekundärer Modifikationen wie Sterilisierung, Trocknung oder Verpackung Berücksichtigung finden.²⁵

3.1 Varianten von Drug-Delivery-Systemen

Entgegen der konventionellen Verabreichungsformen, die hauptsächlich auf Tabletten für die orale oder als Lösung für die intravenöse Applikation beruhen, werden mittlerweile vermehrt kontrollierte und zielgerichtete Drug-Delivery-Systeme erforscht, um eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration ausschließlich am Zielort zu erreichen.²⁴ Mit einem Wirkstofftransportsystem sollen Interaktionen mit der biologischen Umgebung vermieden werden, um den Einfluss möglicher Nebenreaktionen gering zu halten. Je nach Anwendung variiert die Erscheinungsform von Wirkstoffstofffreisetzungssystemen erheblich und kann unter anderem als Mizelle, Liposom, Nanosphäre, Nanokapsel oder Hydrogel vorliegen.²⁶ Zur besseren Verständlichkeit wird in der Folge eine kurze Abgrenzung der unterschiedlichen Erscheinungsformen vorgenommen, bevor anschließend auf die Wirkstofffreisetzung

einzelner Systeme durch externe Stimuli wie z.B. pH-Wert-Änderungen, saure Katalyse oder enzymatische Reaktionen eingegangen wird.

3.1.1 Mizellen

Mizellen sind Aggregate aus amphiphilenⁱ oder grenzflächenaktiven Molekülen, die sich aufgrund des hydrophoben Effekts zusammenlagern. Die klassische Seifenmizelle besteht gemäß nachstehender Abbildung 3—1 aus Fettsäuren, die sich in wässrigen Lösungen spontan zu sphärischen Partikeln umlagern können. Dieser Selbstorganisationsprozess beruht auf der amphiphilen Natur der Fettsäuren, die sich durch einen hydrophilen Teil, der polaren Kopfgruppe, sowie einen hydrophoben Teil auszeichnen. In wässriger Lösung orientiert sich der hydrophile Teil der Fettsäure aufgrund seiner Polarität zum Wasser, während der hydrophobe Teil in das Innere der Mizelle gerichtet ist.

Die Ausbildung von mizellaren Strukturen für den Einsatz als Drug-Delivery-System verläuft mittlerweile häufig ausgehend von entsprechenden Blockcopolymeren. Durch die Verwendung von geeigneten Lösungsmitteln, in denen ein Block eine gute Löslichkeit aufweist, während der andere Block schlechter löslich ist, können durch die Neuordnung von unlöslichen Segmenten Mizellen erhalten werden.²⁷ In wässrigen Systemen können auf diese Weise Strukturen präpariert werden, bei denen die hydrophoben Ketten in das Innere zeigen, während die hydrophilen Reste in das umgebende Wasser gerichtet sind. Durch die Hydrophobizität der Kavität ist es hierbei nicht möglich, hydrophile Wirkstoffe einzulagern. Neben diesen Standardmizellen können in entsprechenden unpolaren Lösungsmitteln auch inverse Mizellen erzeugt werden, bei denen die hydrophoben Reste die Schale und die hydrophilen Gruppen den Kern bilden.²⁸

ⁱ Als amphipil werden Substanzen bezeichnet, welche einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil aufweisen.

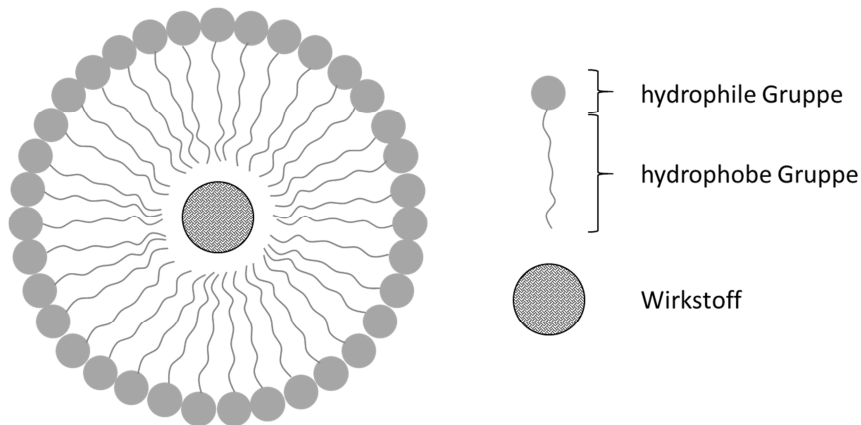


Abbildung 3—1 Schematische Darstellung einer Standardmizelle bei der die hydrophilen Gruppe die Schale und die hydrophoben Anteile den Kern bildet.

Die vergleichsweise simple Herstellung, ihre Stabilität, die Einfachheit der Beladung mit hydrophoben Wirkstoffen und die Kontrolle der Wirkstofffreisetzung machen Mizellen zu einem potenten Drug-Delivery-System.²⁹ Der Einsatz von Mizellen in pharmazeutischen Anwendungen hat sich seit einigen Jahrzehnten durch die Möglichkeit der Inkorporation von hydrophoben Wirkstoffen bewährt. Für weitere Informationen zur Präparation von Mizellen, der Wirkstoffbeladung und –freisetzung sei auf die weiterführende Literatur verwiesen.^{27,30}

3.1.2 Liposome

Als Liposome werden Vesikel bezeichnet, die häufig aus amphiphilen Molekülen wie Fettsäuren oder Phospholipiden bestehen, die in Anwesenheit von wässrigen Medien durch hydrophob-hydrophile Wechselwirkungen selbstassoziierende Strukturen mit einer Membrandoppelschicht und einem wässrigen Kern bilden können.³¹ Der schematische Aufbau eines Liposoms ist in Abbildung 3—2 dargestellt. Es können sowohl hydrophile Wirkstoffe in die Kavität als auch lipophile Substanzen in der Membrandoppelschicht eingelagert werden.^{31,32}

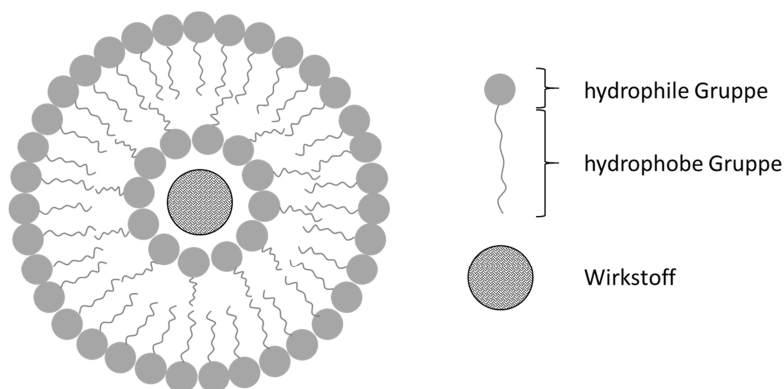


Abbildung 3—2 Schematische Darstellung eines Liposoms mit Membrandoppelschicht.

Liposomen lassen sich vielfältig modifizieren und Eigenschaften wie die Wirkstofffreisetzung, *in vivo*-Stabilität und Biodistribution können durch die Größe, die Oberflächenladung und –hydrophobie sowie die Membranfluidität beeinflusst werden.³³ Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass Liposomen zur Verbesserung der Effizienz bei gleichzeitiger Verminderung der Toxizität einzelner Wirkstoffe dienen können.³⁴ Bislang konnten neben Antikrebswirkstoffen und antimikrobiellen Substanzen auch Makromoleküle wie DNA und Proteine eingekapselt werden.³⁵ Die liposomale Freisetzung von Antikrebsmitteln zeigte dabei eine deutliche Verlängerung der systemischen Aktivität des Wirkstoffs und erleichterte zugleich die zielgerichtete Medikation von Tumoren aufgrund erhöhter Endothelpermeabilität.³⁵

3.1.3 Hydrogele

Hydrogele werden gemäß Abbildung 3—3 als dreidimensionale Polymernetzwerke charakterisiert, die aufgrund von physikalischen oder kovalenten Quervernetzungen miteinander verknüpft sind und in Anwesenheit von Wasser aufquellen können.³⁶ Die Wasseraufnahmefähigkeit und die daraus resultierende Quellung der Materialien sind auf kapillare, osmotische und solvatisierende Kräfte zurückzuführen. Dabei fungiert das Hydrogel als semi-permeable Membran, die das Polymer aufgrund der Vernetzung in der Gelphase hält, während das Lösungsmittel ungehindert hineindiffundieren kann. Der maximale Quellungsgrad des Netzwerks wird hauptsächlich durch das Lösungsmittel und den Vernetzungsgrad beeinflusst.^{36,37}

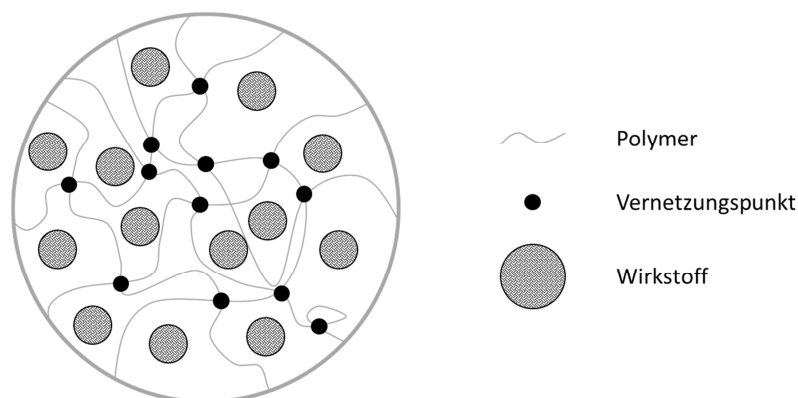


Abbildung 3—3 Schematische Darstellung eines Hydrogels.

Durch die hohe Wasseraufnahmefähigkeit werden Hydrogele für Anwendungen im klinischen Bereich wie beispielsweise Tissue Engineering bzw. regenerative Medizin, Diagnostik, zelluläre Immobilisierung oder als Drug-Delivery-System eingesetzt.³⁶ Generell weisen Hydrogele eine gute Biokompatibilität auf, die hauptsächlich auf dem hohen Wasseranteil basiert. Daraus resultiert eine physikochemische Ähnlichkeit, hinsichtlich der

Zusammensetzung als auch der mechanischen Eigenschaften, gegenüber der extrazellulären Matrix. Die Biodegradabilität respektive die Auflösung des Hydrogels infolge von enzymatischen, hydrolytischen oder anderen Stimuli, wie pH-Wert- oder Temperaturänderungen, kann durch die Wahl des Monomersystems eingestellt werden. Durch die Verwendung von hydrophilen Materialien eignen sich Hydrogele vorwiegend für hydrophile Wirkstoffe. Die Einkapselung von hydrophoben Wirkstoffen, vor allem hinsichtlich Homogenität und Beladungsmenge, kann sich hingegen als problematisch erweisen. Durch den hohen Wassergehalt und ungeeignete Porengrößen kann eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung resultieren. Des Weiteren ist bei vielen Hydrogelen eine Anwendung als Implantatbeschichtung erforderlich, da eine Injektion durch die hohe Viskosität der Materialien nicht ratsam ist.³⁶

3.1.4 Nanopartikel

Grundsätzlich werden alle kolloidalen Systeme mit einem Partikeldurchmesser von 1-100 nmⁱⁱ als Nanopartikel bezeichnet.³⁸ Je nachdem, wie der Wirkstoff eingeschlossen ist, werden zwei Arten unterschieden: Nanokapseln und Nanosphären (Abbildung 3–4). Nanokapseln bestehen aus einem Kern sowie einer Schale und ähneln vom Aufbau daher den bereits vorgestellten Mizellen (Kapitel 3.1.1) und Liposomen (Kapitel 3.1.2).³⁸ Sie können als vesikuläre Systeme verstanden werden, in denen der Wirkstoff üblicherweise im flüssigen Kern bzw. der Kavität lokalisiert ist und von einer Polymerschale umschlossen wird. Als Nanosphären hingegen werden Polymermatrices bezeichnet, bei denen der eingeschlossene Wirkstoff statistisch verteilt im Innern der Partikel vorliegt.^{25,39} Die Wirkstofffreisetzung kann durch Diffusions- oder Degradationsprozessen erfolgen und ist direkt abhängig von der jeweiligen Zusammensetzung der Polymermatrix und deren Verhalten gegenüber dem umgebenden Medium.

ⁱⁱ Die in dieser Arbeit beschriebenen Partikelsysteme weisen höhere Partikelgrößen als 100 nm auf und müssten daher korrekterweise als Submikronpartikel bezeichnet werden.

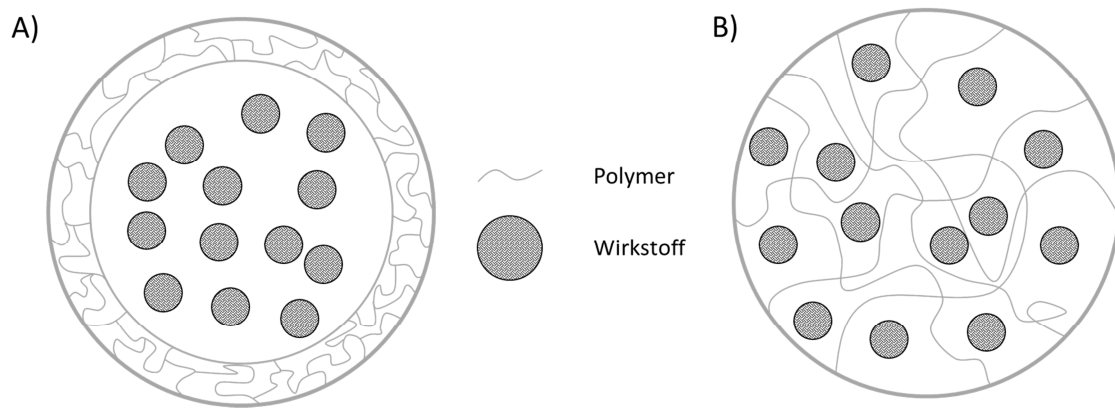


Abbildung 3—4 Schematische Darstellung einer A) Nanokapsel und einer B) Nanosphäre.

Die mögliche Relevanz von Nanosphären und Nanokapseln im medizinischen Bereich wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Dabei wurde das Potential der Nanopartikel als Drug-Delivery-System aufgrund ihrer ausreichenden Stabilität, ihrer hohen Einkapselungseffizienz, ihrer Möglichkeit hydrophile und hydrophobe Substanzen einzuschließen und ihrer Applikation über verschiedene Wege (oral, subkutan, intravenös, etc.) klar hervorgehoben. Nanopartikel können aufgrund ihrer geringen Größe leicht von Zellen aufgenommen werden und selbst biologische Barrieren wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke oder die mucosale Schranke überwinden.^{40,41} Damit besteht die Möglichkeit, Wirkstoffe zu einem Zielort zu transportieren. Durch eine entsprechende Modifikation des Partikelsystems hinsichtlich der Komponenten und der daraus resultierenden Oberflächenladung kann die Wirkstofffreisetzung beeinflusst werden.^{25,41} Die Partikelbildung selbst kann generell über folgende Mechanismen erfolgen:

- kovalente Vernetzung
- ionische Vernetzung
- „self-assembly“ über hydrophobe Modifikation
- Desolvatation (für proteinbasierte Nanopartikel).²⁶

Aufgrund der milden Partikelbildungseigenschaften und der simplen Durchführbarkeit werden häufig ionische Vernetzungsreaktionen bevorzugt.⁴² Durch den Einsatz von wässrigen Systemen kann die Verwendung von toxikologisch-bedenklichen organischen Lösungsmitteln umgangen werden.⁴³ Ferner werden hohe Scherkräfte vermieden, wodurch die Aktivität der Wirkmoleküle erhalten bleibt.⁴³ Mithilfe einer Polyelektrolytkomplexierung können die hergestellten Nanopartikel mit einem „Layer-by-Layer“-Ansatz zudem mit weiteren ionisch geladenen Schichten versehen werden.^{44,45} Dadurch wird neben den

mechanischen Eigenschaften auch die Permeabilität der Materialien beeinflusst, wodurch die Freisetzungskinetik der Wirkstoffe direkt angepasst werden kann.^{44,45} Ionisch vernetzte Nanopartikel besitzen im Gegensatz zur kovalenten Vernetzung zudem weitere Vorteile, da auf mögliche toxische Reagenzien verzichtet wird und unerwünschte Nebenreaktionen vermieden werden.⁴² Dementgegen führen jedoch kovalent vernetzte und über „self-assembly“ erhaltene Nanopartikel zu stabileren Formulierungen, da etwaige Effekte wie z.B. durch pH-Wertänderungen weitgehend kompensiert werden können.^{42,46}

3.1.5 Dendrimere

Dendrimere sind hochverzweigte, globuläre Moleküle mit geringer Polydispersität und genau definierter Größe und Form.^{47,48} Sie weisen eine gute Stabilität auf und können auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt werden (Abbildung 3—5). Die divergente Synthese geht von einem Kernmolekül aus, an dem durch wiederholende Reaktionsschritte immer neue Moleküle addiert werden.^{48,49} Die konvergente Synthese hingegen beschreibt den Aufbau der Dendrimere aus kleinen Molekülen (so genannten Dendronen), die durch einzelne Reaktionen miteinander verknüpft werden.^{48,49}

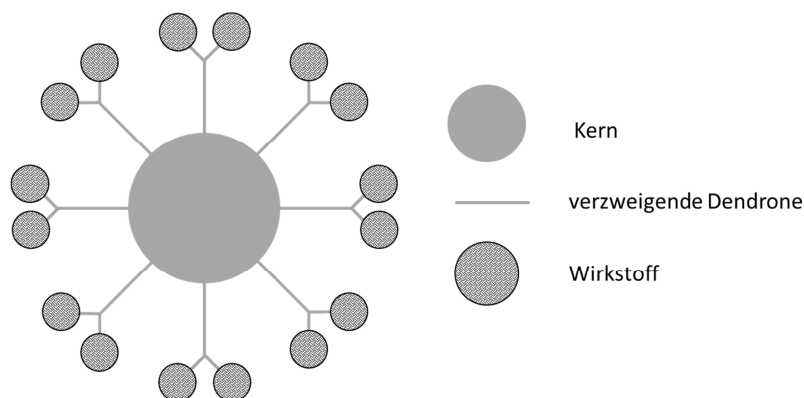


Abbildung 3—5 Schematische Darstellung eines Dendrimers.

Dendrimere besitzen ein großes Potential als Drug-Delivery-System, da Wirkstoffe, wie in Abbildung 3—5 gezeigt, entweder chemisch an die Oberfläche gebunden oder physikalisch nahe des Kerns adsorbiert werden können.⁴⁷ Durch die Verästelung der Dendrimere wird eine vorzeitige Freisetzung der Wirkmoleküle verhindert.⁴⁷ Als Nachteil erweist sich hingegen der hohe präparative Aufwand bei der Herstellung der Dendrimere, welcher eine Vergrößerung des Ansatzes nicht problemlos möglich macht.⁴⁸ Ferner werden Dendrimere aufgrund ihrer geringen Größe von bis zu 10 nm relativ schnell infolge der natürlichen Nierenfunktion ausgeschieden, weshalb vermehrt PEGylierungs-Ansätze zur verlängerten Verweilzeit im Körper dienen sollen.⁴⁸

3.2 Stimuli-responsive Drug-Delivery-Systeme

Der Einsatz Stimuli-responsiver Materialien stellt eine interessante Möglichkeit zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen und Genen dar.⁵⁰ Solche Drug-Delivery-Systeme werden dementsprechend nicht mehr nur als passive Komponenten verstanden, sondern können durch ihre Labilität, als Folge externer Einflüsse, direkt aktiv der jeweiligen Erkrankung entgegenwirken. Daher kann bei der Verwendung geeigneter Materialien beispielsweise gezielt auf pathogene Faktoren reagiert werden. Auf diese Weise wurden bereits verschiedene Ansätze für die Bereitstellung von Wirkstoffen untersucht, die sich als Konsequenz Pathogen-induzierter Stimuli wie pH-Wert^{51,52}, Temperaturänderungen⁵³ und Redox^{54,55} respektive enzymatischer Reaktionen^{56–58} oder externer physikalischer Stimuli wie äußeren Magnetfeldern⁵⁹, Ultraschall⁶⁰ oder Licht⁵³ ergeben.

3.2.1 pH-responsive Drug Delivery Systeme

Die offensichtliche *pH-Wertänderung* im Gastrointestinaltrakt (GIT) des Menschen von sauer im Magen (pH 2) bis hin zu basisch in der Darmregion (pH 5 bis pH 8) sollte für die Entwicklung von oralen Drug-Delivery-Systemen berücksichtigt werden.⁶¹ Darüber hinaus wird auch durch pathogene Faktoren wie Krebserkrankungen oder entzündetes Gewebe im menschlichen Organismus sowohl das extra- als auch das intrazelluläre pH-Profil massiv beeinflusst.^{61,62} So führen chronische Wunden bekanntermaßen zu pH-Werten zwischen 7,4 und 5,4⁶³, während beispielsweise für Tumore eine signifikante Erniedrigung des extrazellulären pH-Wertes auf 6,5 im Vergleich zu Blut (pH 7,4 bei 37 °C) beobachtet werden kann.⁶⁴ Zusätzlich sind die pH-Werte der endosomalenⁱⁱⁱ und lysosomalen^{iv} Vesikel im Zellinnern gegenüber dem zytosolen^v pH-Wert deutlich verringert.⁶⁴ Durch die Wahl eines geeigneten Drug Delivery Systems kann diese pH-Wertänderung ausgenutzt werden, um eine spezifische Wirkstofffreisetzung in den extra- oder intrazellulären Raum einzuleiten. Nachstehend soll lediglich auf Drug-Delivery-Systeme zur Bereitstellung von Wirkstoffen als Folge pathogener Erkrankungen eingegangen werden. Für Arbeiten zur Wirkstofffreisetzung als Konsequenz von pH-Wertänderungen entlang des Magen-Darmtraktes werden die nachstehenden Veröffentlichungen von GAO et al.⁵¹ und PHILIP et al.⁶⁶ empfohlen.

ⁱⁱⁱ Endosomen sind intrazelluläre Vesikel, die infolge eines zellulären Stoffaufnahme Prozesses entstanden sind.⁶⁵

^{iv} Lysosomen sind Zellorganellen im Zytoplasma, deren Hauptaufgabe der Abbau von durch die Zelle aufgenommenen Stoffen sind.⁶⁵

^v Als Zytoplasma wird der flüssige Bestandteil des Zytoplasmas der eukaryotischen Zellen bezeichnet.⁶⁵

Der pH-Wert im gesunden menschlichen Körper liegt laut TANNOCK et al., abhängig von der jeweiligen Region für subkutanes Gewebe, zwischen 7,00 – 8,03 und für Muskelgewebe zwischen 7,10 – 8,06.⁶⁷ Dementgegen unterscheidet sich der pH-Wert in infektiösem Gewebe mit pH 7,00 gegenüber gesundem Gewebe um etwa 0,5 pH-Einheiten.⁶⁸ In Tumoren ist der pH-Wert nochmals deutlich abgesenkt und wird zwischen 5,85 – 7,68 angegeben.⁶⁷ Der relativ breite pH-Bereich wird durch die Kombination verschiedener Faktoren hervorgerufen, wie beispielsweise der *inter*-Tumor-Variation (Tumorgröße, Nekroseggrad, Wachstumsgeschwindigkeit), der *intra*-Tumor-Variation (Heterogenität des Gewebes, Nähe zu Blutgefäßen) und möglichen Variationen zwischen Tumorarten (Pathologie).⁶⁸ Die gesteigerte Azidität wird durch die Akkumulation von Milchsäure in wachsenden Tumorzellen verursacht, die als Folge der zunehmenden Glukoseaufnahme bei verminderter oxidativer Phosphorylierung hervorgerufen wird. Durch diese Laktatproduktion in Gegenwart von Sauerstoff finden Tumore *in vivo* geeignete Wachstumsbedingungen. Darüber hinaus leisten typische Symptome, wie eine ungenügende Blutversorgung und schwache lymphatische Ausscheidungen, einen signifikanten Beitrag zur sauren Mikroumgebung in Tumoren.⁶⁷

Der pH-Wertunterschied zwischen gesundem und pathogenem Gewebe wird bei Ansätzen zur Entwicklung pH-responsiver Nanocarrier genutzt, um den eingekapselten Wirkstoff direkt zum Infektionsort zu transportieren und dort freizusetzen. Zumeist werden dort solche Nanocarrier verwendet, deren physikalische und chemische Eigenschaften wie Löslichkeits- oder Quellungseffekte als Konsequenz von pH-Wertänderungen variieren. Dabei fällt auf, dass nahezu alle in *Kapitel 3.1* vorgestellten Formen von Drug-Delivery-Systemen zum Einsatz kommen. Die chemische Struktur der verwendeten Materialien bestimmt hierbei, ob das System eher als Mizelle, als Nanopartikel oder als Dendrimer zum Einsatz kommt.

Die Verwendung von *Quellungseffekten* wurde von GRISET et al. beschrieben, wobei Hydroxygruppen Acrylat-basierter Polymere mit pH-labilen hydrophoben Schutzgruppen wie 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd maskiert wurden. Die hergestellten Nanopartikel zeigten eine gute Stabilität bei neutralen pH-Werten, wohingegen bei schwach aziden Bedingungen (pH 5) die Schutzgruppen abgespalten wurden und freie Hydroxygruppen an der Oberfläche

vorlagen. Diese Transformation von hydrophob zu hydrophil verursachte eine Quellung der Partikel, die sukzessive zur Freisetzung von Paclitaxel^{vi} verwendet wurden.⁷⁰

Neben den Quellungseffekten können auch *Löslichkeitsänderungen* für die Entwicklung pH-responsiver Freisetzungssysteme dienen. Die von NA et al. präparierten, mit Doxorubicin-beladenen^{vii} Mizellen konnten durch die Verwendung der schwachen Säure Sulfonamid im sauren Milieu deprotoniert werden. Auf diese Weise konnte durch die Degradation der Mizellen im leicht aziden Tumorgewebe eine Anreicherung des Doxorubicins erreicht werden.⁷¹ Weitere Arbeiten von LEE et al. mit Mizellen aus Blockcopolymeren wie Poly(L-Histidin)-*b*-Polyethylenglykol in Kombination mit Poly(L-Milchsäure)-*b*-Polyethylenglykol wurden zur Bereitstellung von Adriamycin^{viii} verwendet. Dieses System zeigt einen sehr scharfen Übergang vom deprotonierten, hydrophoben Zustand bei physiologischen pH-Werten von 7,4 hin zum protonierten und destabilisierten Zustand bei pH-Werten von 6,6. Die Untersuchungen bestätigten, dass Adriamycin bei diesem pH-Wert schnell freigesetzt werden konnte.⁷³ Die zuvor präsentierten Nanocarrierformulierungen profitieren von pH-Gradienten im infektiösen Gewebe, um beispielsweise eine gezielte Identifikation und Bekämpfung von Tumoren zu ermöglichen. Darüber hinaus wurden bereits Ansätze auf intrazellulärer Ebene verfolgt, welche die pH-Wertdifferenz von endosomalen und lysosomalen Zellkomponenten im Vergleich zum Zytoplasma ausnutzen. Infolge von endozytotischen Prozessen resultiert eine plötzliche endosomale Azidifizierung, aufgrund eines H⁺-ATPase-vermittelten Protoneneinstroms.⁷⁴ Als Konsequenz sinken die pH-Werte verschiedener Zellkomponenten wie Endosomen und multivesikulärer Körperchen unter pH 6,0. Dieses azide Milieu kann zu Denaturierungsprozessen von empfindlichen Makromolekülen wie DNA, siRNA^{ix} oder Proteinen führen. Der niedrige pH-Wert kann jedoch auch als Triebkraft genutzt werden, um den wirkstoffbeladenen Nanocarrier endosomal aufzunehmen und durch einen „endosomal escape“ in das Zytosol freizusetzen.⁷⁶ In den Arbeiten von SUN et al. und TIETZE et al. wurden beispielsweise Polymere aus aminhaltigen Monomeren verwendet, um den pH-Wert in den Endosomen zu puffern. Anschließend wurden amphiphile und kationische Triblock-Copolymere aus

^{vi} Paclitaxel ist ein zytostatischer Wirkstoff aus der Gruppe der Taxane zur Behandlung verschiedener Krebsarten.⁶⁹

^{vii} Doxorubicin ist ein anthrazyklisches Antibiotikum, welches eine breite Anti-Tumor-Aktivität besitzt und vornehmlich zur Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren dient.⁶⁹

^{viii} Adriamycin® ist neben Rubex® ein weiterer Handelsname von Doxorubicin Hydrochlorid.⁷²

^{ix} siRNA (small interfering RNA) sind kurze, einzel- oder doppelsträngige Ribonukleinsäuremoleküle mit 20 bis 25 Basenpaaren.⁷⁵

Monomethoxypolyethylenglykol, Poly(ϵ -Caprolacton) und Poly(2-Aminoethylethylenphosphat), respektive β -Propionamid vernetzte Oligoethyleniminpolymere, für die Bereitstellung von siRNA hergestellt.⁷⁷ Von SHENOY et al. wurden biodegradierbare Poly(β -aminoester) untersucht, die sich bei pH-Werten im Bereich von 6,5 auflösen. Dadurch konnte die Freisetzung von kleinen Wirkstoffen, aber auch DNA- und siRNA-Molekülen nachgewiesen werden.⁷⁸ Aus diesen Veröffentlichungen wird deutlich, dass pH-sensitive Mechanismen auch intrazellulär eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Wirkstoffen und Makromolekülen wie DNA, siRNA oder Proteinen in das Zytoplasma spielen.

Der Einsatz von pH-responsiven Nanomaterialien stellt einen wichtigen Ansatz zur gezielten Wirkstoffverabreichung in pathogenen Situationen dar. Nichtsdestotrotz sollte stets bedacht werden, dass pH-sensitive Systeme sehr selektiv auf geringste pH-Wertänderungen antworten müssen. Die Einführung von zusätzlichen Quervernetzungen könnte zudem einen weiteren Aufreinigungsschritt erforderlich machen, um potentielle, schädliche chemische Substanzen zu vermeiden.

3.2.2 Temperatur-responsive Drug Delivery Systeme

Neben pH-Wertänderungen können *Temperaturanstiege* als Folge einer Erkrankung im umliegenden Gewebe beobachtet werden, die hauptsächlich aus der verstärkten Replikationsaktivität der Zellen resultieren.⁷⁹ Durch die Entwicklung Temperatur-sensitiver Drug-Delivery-Systeme könnte zum Beispiel eine Wirkstofffreisetzung bei erhöhten Körpertemperaturen über 37 °C realisiert werden. Derlei Ansätze würden den aktiven Wirkstoff im systemischen Kreislauf abschirmen, während erhöhte Temperaturen im infizierten Gewebe oder extern herbeigeführte hypertherme Stimuli zu einer lokalisierten Freisetzung in der gewünschten Region führen würden.⁸⁰ Für die Entwicklung derartiger thermo-responsiver Drug-Delivery-Systeme sollten die folgenden Faktoren berücksichtigt werden:

- Die Übergangstemperatur von Sol- zu Gelzustand sollte über der Körpertemperatur, aber unter einer für den humanen Organismus schädigenden Temperatur, liegen.
- Die eingesetzten Wirkstoffcarrier sollten im physiologischen Milieu bei 37 °C stabil sein und erst bei erhöhten Temperaturen degradiert oder aufgelöst werden.

- Die Thermosensitivität sollte in einem relativ engen Temperaturbereich liegen, um eine hohe Effektivität zu gewährleisten.⁸¹

Für die Bereitstellung von Wirkstoffen aus solchen Nanocarriern haben sich Temperaturabhängige Systeme bewährt, in deren Folge Eigenschaften wie die Konformation, Löslichkeit oder das Gleichgewicht zwischen hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen beeinflusst werden.⁸² Dieses Verhalten wird gemeinhin als „lower critical solution temperature“ (LCST) bezeichnet und ist charakteristisch für einige Polymere wie z.B. Poly(N-isopropylacrylamid), Poly(N,N-diethylacrylamid) oder Poly(N-vinylcaprolacton).⁸³ Daraus hergestellte Polymerlösungen zeigen einphasiges Verhalten bei Temperaturen unter der LCST, wohingegen über der LCST zweiphasige Systeme durch die Aggregation von Polymerketten entstehen.⁸² Diese Löslichkeitsänderung wird sich für viele thermo-responsive Drug-Delivery-Systeme zu Nutze gemacht und hängt maßgeblich vom Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Anteilen im Polymer ab.⁸³ Poly(N-isopropylamid) (PNIPAM) wird wegen der Körpertemperatur des Menschen ähnlichen LCST von 30 – 34 °C von den oben genannten Polymeren am häufigsten für biomedizinische Anwendungen eingesetzt. Die Verwendung von PNIPAM für Drug-Delivery-Systeme wie Hydrogele, Mizellen oder Partikel ist ausführlich in dem Review-Artikel von GANDHI et al. dargelegt.⁸³

Thermo-responsive Nanocarrier werden als sichere und effektive Drug-Delivery-Systeme eingestuft, in die eine Vielzahl von Wirkstoffen eingelagert werden können. Durch eine direkte Antwort auf hyperthermale Stimuli in pathogenen Geweben wird eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung erreicht. Um die Freisetzungskinetik noch spezifischer zu gestalten, müssen thermo-sensitive Polymere mit genau definierten LCSTs in einem kleinen Temperaturbereich entwickelt werden. Zudem bleibt die Akkumulierung der Nanomaterialien am Zielort eine noch ungelöste Herausforderung.

3.2.3 Redox-responsive Drug Delivery Systeme

Redoxreaktionen können ebenfalls zur Bereitstellung von Wirkstoffen genutzt werden. In Tumorzellen beispielsweise ist die intrazelluläre Redoxpotentialdifferenz um etwa 100 – 1.000-fach höher als im extrazellulären Raum.⁸⁴ Diese Eigenschaft bietet sich für die Bereitstellung von Wirkstoffen wie Gentherapeutika an und ist hauptsächlich auf die Tripeptid-ähnliche Verbindung Glutathion (GSH) zurückzuführen. Glutathion ist ein wichtiges natürliches Antioxidans, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin

aufgebaut ist und im Körper gemäß Abbildung 3—6 als Mischung der reduzierten Form GSH und seiner disulfid-verbrückten dimeren Form GSSG vorkommt. Die Biosynthese von Glutathion findet im Zytosol statt, von wo es in andere Zellkompartimente transportiert wird.^{54,55} Durch den erwähnten Konzentrationsgradienten können Disulfid-verbrückte Nanocarrier eingesetzt werden, welche im intrazellulären Raum durch das Glutathion gespalten werden können. Auf diese Weise könnten Nukleinsäuren wie Plasmid-DNA, siRNA oder Oligonukleotide effizient in die Zelle gebracht werden, da diese Moleküle nur in hoher Dosis therapeutische Effekte zeigen.⁸⁵

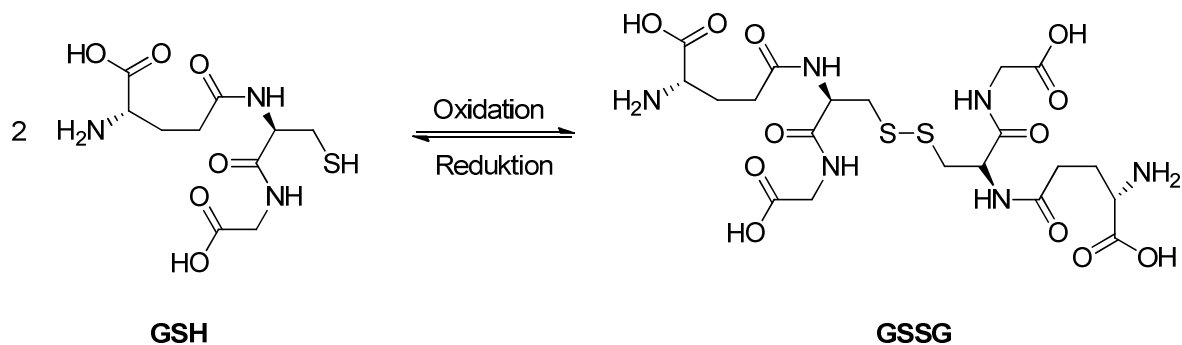


Abbildung 3—6 Reversible oxidative Bildung des Disulfids GSSG.

Die Verwendung von disulfid-verbrückten Nanocarriern bietet den Vorteil, dass in Gegenwart reduktiver Bedingungen, d.h. durch den Überschuss an reduziertem Glutathion (GSH), der eingekapselte Wirkstoff freigesetzt werden kann. Für den Wirkstofftransport zum Zielort muss eine hohe Plasmastabilität der Nanomaterialien gewährleistet werden, um einen vorzeitigen Abbau zu verhindern. Diese Problematik wird häufig durch inter- und intramolekulare Vernetzung der Drug Carrier gelöst. i) Von CAVALLARO et al. wurden Polyaspartamid-Carrier auf Polykationbasis hergestellt. Durch die positiven Ladungen im Polymerrückgrat konnten elektrostatische Wechselwirkungen mit DNA eingegangen werden. Darüber hinaus dienten freie Thiolgruppen als Ausgangspunkt für die Bildung von Disulfidverbrückungen. Dadurch konnten Thiopolyplexe hergestellt werden, welche eine hohe Stabilität im Blutkreislauf aufwiesen. In Gegenwart hoher GSH-Konzentrationen konnte hingegen eine intrazelluläre DNA-Freisetzung beobachtet werden.⁸⁶ ii) Ein weiterer Ansatz von CARLISLE et al. beschäftigt sich mit Nanopartikeln aus Plasmid-DNA (pDNA) in Kombination mit thioliertem Polyethylenimin (PEI-SH). Die erhaltenen Nanopartikel wurden weitergehend mit Thiol-reaktivem Poly[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid] mit 2-Pyridyldisulfanyl- oder Maleimidgruppen beschichtet. So wurden entweder reduzierbare Disulfid-verbrückte oder stabile Thioether-verbrückte Beschichtungen generiert. Es konnte

für die Disulfid-verbrückten Komplexe eine deutlich gesteigerte Transfektionseffizienz^x beobachtet werden, da die Zugabe des Reduktionsreagenzes Dithiothreitol (DTT) eine fast vollständige Freisetzung der DNA bewirkt.⁸⁸ iii) Die Verwendung von semisynthetischen Biopolymeren wie Chitosan in reduktiver Umgebung wurde von SCHMITZ et al. untersucht. Dafür wurden einzelne freie Amingruppen des Chitosans mit 2-Iminothiolan zu Chitosan-Thiobutylamidin-Konjugaten umgesetzt. Dadurch wurde ein Redox-sensitives Polymer generiert, aus dem in Verbindung mit Plasmid-DNA (pDNA) Nanopartikel hergestellt werden konnten. Unter Standardzellkulturbedingungen konnte im Vergleich zu unmodifizierten Chitosan-pDNA-Partikeln eine ausreichende Stabilität beobachtet werden. Erst nach Inkubation in Gegenwart von DTT konnte eine kontrollierte Freisetzung der Plasmid-DNA erreicht werden.⁸⁹

Die Redoxresponsivität von Disulfidbrücken wurde auch bei der gezielten liposomalen Wirkstoffbereitstellung ausgenutzt. Ähnlich wie bei den zuvor thematisierten Nanocarriern dienen hierbei ebenfalls freie Thiole als Ausgangspunkt für die Disulfidvernetzung. Diese Liposomen können daher im intrazellulären Raum als unmittelbare Antwort auf erhöhte Glutathionkonzentrationen destabilisiert werden und den eingekapselten Wirkstoff am Zielort freisetzen. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 erläutert, basieren Liposomen typischerweise auf hydrophob-hydrophilen Wechselwirkungen amphiphiler Molekülen wie Phospholipiden. Disulfid-verbrückte Liposomen werden standardmäßig hergestellt, indem Phospholipide zusammen mit kleinen Lipiden eingesetzt werden, bei denen die hydrophoben und hydrophilen Gruppen durch Disulfidbindungen vernetzt wurden. Diese Liposomen weisen eine hohe Stabilität in nicht-reduktiver Umgebung auf, während in Gegenwart von DTT oder GSH eine Wirkstofffreisetzung initiiert wird.⁹⁰ Des Weiteren wurden von HUANG et al. disulfid-verbrückte Thiocholesterol-basierte kationische Lipide hergestellt, welche in Liposomen zur Einkapselung von DNA verwendet werden könnten. In Anwesenheit von reduzierenden Reagenzien wie DTT, selbst in geringen Konzentrationen, konnte deutlich gezeigt werden, dass DNA spezifisch freigesetzt werden kann.⁹¹

Im Hinblick auf den geringen physikochemischen Unterschied zwischen normalem und cancerogenem Gewebe, speziell für die angesprochenen pH- und Temperatur-sensitiven Drug-Delivery-Systeme, stellen *Redox-responsive* Nanocarrier eine hervorragende Alternative für eine gezielte, nicht-invasive Wirkstofffreisetzung dar. Vor allem die

^x Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet.⁸⁷

erwähnten unterschiedlichen Redoxpotentiale zwischen intra- und extrazellulärem Raum ermöglichen hierbei eine bioresponsive Bereitstellung von Wirkstoffen. Insbesondere die Verwendung von Redox-labilen Verbindungen mit Disulfidvernetzungen hat sich bislang als vielversprechend erwiesen.

3.2.4 Enzym-responsive Drug Delivery Systeme

Als weiteren Stimulus können *Enzyme* verstanden werden, welche in Gegenwart beziehungsweise als Folge von Infektions- oder Inflammationsreaktionen spezifisch freigesetzt oder überreguliert werden. Diese Enzym-labilität kann für eine Degradation von Nanocarriern mit anschließender Wirkstofffreisetzung verwendet werden.⁵⁷ Durch das spezifische Design der Nanomaterialien können hierdurch kontrollierte Freisetzungskinetiken erreicht werden. Solche Drug-Delivery-Systeme bestehen häufig aus einem Biopolymergrundgerüst, welches selbst degradiert werden kann, oder beinhalten einen Enzym-labilen Crosslinker.

BAIER et al. konnten beispielsweise Polyhexanid-beladene Hyaluronsäurenanokapseln über einen Miniemulsionsprozess herstellen. Der Wirkstoff Polyhexanid konnte anschließend *in vitro* mithilfe des Enzyms Hyaluronidase freigesetzt werden.⁵⁸ Hyaluronidase wird typischerweise bei Brandwunden überexprimiert und führt neben anderen Enzymen zur Bildung von Abszessen.⁹² Ein ähnlicher Ansatz wurde von POTH et al. verfolgt, der Polyelektrolytkomplexe aus dem semisynthetischen Polymer Chitosan und dem Vernetzer Natriumtripolyphosphat zur Präsentation von biologisch aktivem „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) verwendet hat. In Abhängigkeit vom Deacetylierungsgrad des Chitosans, gleichbedeutend mit dem Amingehalt im Polymer, konnte ein unterschiedliches Degradationsverhalten beobachtet werden. Dabei wurde deutlich, dass das BMP-2 in Gegenwart von Lysozym deutlich schneller aus den Nanopartikeln mit niedrig deacetyliertem Chitosan (geringerer Amingehalt) freigesetzt werden konnte.⁹³

Neben der Degradation des Biopolymers wird häufig auch eine Protease-labile Peptidsequenz als Vernetzer verwendet. Diese Strategie bietet die Möglichkeit die jeweilige Spaltsequenz des Peptids zu verändern, um damit unterschiedliche Enzyme zu adressieren und auf diese Weise die Freisetzungskinetik zu steuern. i) Dieser Ansatz wurde von SELIKTAR

et al. gewählt, indem funktionalisierte MMP-2-labile^{xi} Peptide zur Vernetzung von Acrylat- oder Vinylsulfon-haltigen PEG-Ketten entwickelt wurden. Durch die Anwesenheit von Cysteingruppen am C- und am N-terminalen Ende des Peptids konnte eine MICHAEL-Addition der freien Thiolgruppen mit den ungesättigten Doppelbindungen des modifizierten PEGs durchgeführt werden. Es konnte eine ausreichende Stabilität der Materialien über einen Zeitraum von etwa 14 Tagen gezeigt werden, während in Gegenwart der Protease MMP-2 eine Freisetzung des eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes innerhalb weniger Stunden beobachtet werden konnte.⁹⁵ ii) Von FONSECA et al. wurden auf Basis des Biopolymers Natriumalginat dreidimensionale Hydrogelsubstrate für Zellkulturanwendungen entwickelt. Die Vernetzung erfolgte dabei ähnlich wie bei SELIKTAR et al. mit einem MMP-sensitiven Peptid. Zusätzlich wurden in das Netzwerk so genannte RGD-Peptide^{xii} inkorporiert, welche für eine verbesserte Zelladhäsion sorgen sollen. Es konnte in der Veröffentlichung gezeigt werden, dass die Kombination aus MMP-sensitiven Peptiden und RGD-Peptiden zu einer verbesserten Zell-Matrix-Interaktion führt.⁹⁸ iii) Ein anderer Ansatz von FUCHS et al. beschreibt die Herstellung von Nanopartikeln auf Basis von Polystyrol-Peptid-Polystyrol-Triblockpolymeren. Als Peptide wurden Trypsin- und Hepsin-labile Aminosäuresequenzen verwendet, da diese beiden Enzyme im frühen Stadium von Prostatakrebs überreguliert werden. *In vitro*-Studien zeigten die Freisetzung des eingekapselten Fluoreszenzfarbstoffes nach Zugabe der jeweiligen Protease.⁹⁹ iv) Die Wirkstofffreisetzung aus den Nanomaterialien als direkte Antwort auf inflammatorische Reaktionen wurde auch von WEN et al. verfolgt, indem Nanokapseln auf Basis der zu verabreichenden Proteine BSA (Bovines Serumalbumin) und VEGF (vaskulärer endothelischer Wachstumsfaktor) hergestellt wurden. Um das jeweilige Protein wurden in einem ersten Schritt Monomere wie N-(3-Aminopropyl)aminomethacrylamid (APM), Acrylamid (AAM), aber auch Peptid-labile und nicht-degradierbare Vernetzungsreagenzien angereichert. Die anschließende *in situ*-Polymerisation diente zur Bildung einer Polymerhülle um das Protein. Degradationsexperimente der Polymerhülle durch die Zugabe der infektionsrelevanten Serinprotease Plasmin führten zur Freisetzung der Proteine.¹⁰⁰ v) Die Verwendung von Enzym-labilen Crosslinkern wurde von WANAKULE et al. für die Präparation von Nanopartikeln in responsiven Mikrogelen beschrieben. Die Mikrogele wurden über eine Vernetzung von 4-

^{xi} MMP-2 (auch Matrixmetalloproteinase-2) ist ein Protein, welches beim Abbau der extrazellulären Matrix infolge normaler aber auch pathogener Prozesse beteiligt ist.⁹⁴

^{xii} RGD ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure, welche als Zellbindungsdomäne fungieren kann.^{96,97}

Arm-Polyethylenglykolacrylat und einer Trypsin-labilen Peptidsequenz durch Michael-Addition in einer Wasser-in-Öl-Emulsion durchgeführt. Während der Herstellung der Mikrogele wurden zudem Nanopartikel aus Polylactid-co-Glykolid (PLGA) und Fluorophore hinzugefügt. Die anschließende Degradation des Mikrogels mit Trypsin zeigte eine fast vollständige kumulative Freisetzung der eingekapselten Nanopartikel.¹⁰¹

Im Vergleich zu thermo-, pH- oder Redox-responsiven Drug-Delivery-Systemen stellt der Einsatz von enzymatisch spaltbaren Nanomaterialien eine deutlich effektivere Methode dar, um auf Infektionen oder Inflammationen direkt zu antworten. Vor allem durch die Inkorporierung von peptidischen Vernetzern können einzelne, bei Krankheiten überregulierte oder exprimierte, Enzyme angesprochen werden. Dadurch bietet sich die Möglichkeit einer spezifischen zielgerichteten Wirkstofffreisetzung. Des Weiteren können durch eine simple Variation der Spaltsequenz andere Enzyme adressiert werden, wodurch die Freisetzungskinetik des Systems relativ einfach verändert werden kann.

3.2.5 Physikalische Stimuli

Zusätzlich zu den bereits erläuterten Pathogen-induzierter Stimuli werden mittlerweile auch vermehrt physikalische Faktoren, wie der Einfluss von Magnetfeldern oder Ultraschallbehandlungen, betrachtet. Damit können beispielsweise Wirkstoff-beladene Eisenoxid-Nanopartikel durch Anlegen eines magnetischen Feldes zielgerichtet an den gewünschten Ort dirigiert und dort akkumuliert werden.⁵⁹ Eine lokale Ultraschallbehandlung wurde beispielsweise zur Bereitstellung von Wirkstoffen aus vorher injizierten Mizellen eingesetzt, um durch die daraus resultierende homogenere Verteilung der Mizellen im Tumorgewebe die Aufnahme des Wirkstoffs zu erleichtern.¹⁰² Zudem werden Licht-responsive Nanocarrier erforscht, welche in Gegenwart elektromagnetischer Wellen im sichtbaren Bereich einen reversiblen Mizellenbildungs- /Mizellenabbauprozess durchlaufen können.¹⁰³ Für weiterführende Literatur zum Thema „physikalische Stimuli“ sei auf die Publikation von LOPES et al. verwiesen.⁶²

3.2.6 Dual-responsive Nanocarrier

Um den Wirkstofftransport noch weiter zu optimieren, z.B. für komplexe pathogene Bedingungen, werden mittlerweile auch duale oder multi-stimuli-responsive Nanocarrier erforscht. Dazu gehören Kombinationen aus dualen Stimuli wie pH/Temperatur, pH/Redox, pH/Enzym, Temperatur/Enzym, pH/pH, Enzym/Enzym, aber auch multiple Stimuli wie

Temperatur/Redox/pH oder Temperatur/pH/Gastmoleküle^{xiii}.¹⁰⁵ Die eigentliche Antwort auf den jeweiligen Stimulus kann dann entweder gleichzeitig am selben Wirkort oder sequentiell in unterschiedlichen Regionen stattfinden. Durch die Selektivität der Nanocarrier zwischen gesundem und pathogenem Gewebe kann der zielgerichtete Transport und die Freisetzung des Wirkstoffs dadurch erheblich verbessert werden.¹⁰⁵ Die wesentlichsten Konzepte der multi-stimuli-responsiven Drug-Delivery-Systeme werden nachstehend kurz erläutert.

Die Kombination von *pH*- und *Temperatur-responsiven* Nanopartikeln gehört zu den bislang am weitreichendsten untersuchten dual-sensitiven Nanomaterialien. Das grundlegende Konzept sieht häufig die Copolymerisation von pH-sensitiven Komponenten, wie schwachen Säuren, mit Temperatur-responsiven Polymeren, wie PNIPAAm, vor. Die erhaltenen Copolymere weisen in der Folge eine pH-abhängige LCST auf. Dieser Phasenübergang aufgrund simpler pH-Wertänderung wurde bereits für die Entwicklung von pH-sensitiven Antitumorpräparaten verwendet. So konnten SOPPIMATH et al. zeigen, dass selbstorganisierende Kern-Schale-Nanopartikel aus dem PNIPAAm-co-N,N-Dimethylacrylamid-co-10-Undekansäure-Terpolymer eine hohe Stabilität unter normalen physiologischen Bedingungen aufwiesen (37 °C, pH 7,4), während bei niedrigen pH-Werten eine Deformation beobachtet werden konnte. Bei den *in vitro*-Studien wurde eine erhöhte Freisetzung von Doxorubicin bei leicht sauren pH-Werten um 6,6 (simulierte Tumorbedingungen) festgestellt. In weiteren Experimenten wurden die hydrophoben Gruppen der Nanopartikel mit Cholesterolgruppen und die freien Amine mit Folsäure konjugiert.¹⁰⁶ Auf diese Weise konnten letztlich stabile und Tumor-adressierte Nanopartikel generiert werden, welche Doxorubicin effizient in Gegenwart von Folat-Rezeptoren überexprimierenden Krebszellen freisetzen konnten.¹⁰⁷

Mittlerweile werden vermehrt *pH/Redox dual-responsive* Systeme erforscht, da diese beiden Faktoren in pathogenem Gewebe signifikant beeinflusst werden. Die pH-sensitiven Eigenschaften erleichtern zudem die Herstellung der Nanopartikel in wässrigen Medien, während die *in vivo*-Stabilität durch Disulfidvernetzung gewährleistet wird. Die eigentliche Wirkstofffreisetzung kann entweder bei niedrigeren pH-Werten im Tumorgewebe oder in reduktiver Umgebung in Anwesenheit von GSH erfolgen. Letztlich kann damit eine zielgerichtete Freisetzung in die endo- bzw. lysosomalen Zellkompartimente oder in das

^{xiii} Als Gastmoleküle werden Substanzen bezeichnet, die zusätzlich zu dem eigentlichen Wirkstoff in das Drug-Delivery-System inkorporiert werden. Das umfasst beispielsweise Enzyme, Farbstoffe, Katalysatoren oder Moleküle, die eine Bildgebung ermöglichen.¹⁰⁴

Zytoplasma erreicht werden.¹⁰⁵ ZHANG et al. konnten auf diese Art pH/Redox dual-bioresponsive Polymersome aus Polyethylenglykol-SS-Poly(2-Diethylaminoethylmethacrylat) herstellen, indem der pH-Wert der Lösung auf 7,4 erhöht wurde. Dieses Verhalten erlaubte eine effiziente Beladung mit Proteinen unter milden Bedingungen. Anschließend *in vitro*-Experimente zeigten eine Proteinfreisetzung von unter 20 % nach 8 h bei pH 7,4 und 37 °C, während bei pH 6,0 oder unter reduktiven Bedingungen in Gegenwart von DTT bei pH 7,4 eine signifikante Menge an Protein freigesetzt werden konnte.¹⁰⁸ Von SHU et al. wurden dual-responsive Polyelektrolyt-Nanokapseln auf Biopolymerbasis hergestellt. Dafür wurde Cysteamin-konjugiertes Chitosan und Dextransulfat durch ein „Layer-by-Layer“-Verfahren auf β -Cyclodextrin-funktionalisierte Silicakugeln beschichtet und anschließend oxidativ vernetzt, bevor der Silicakern entfernt wurde. In die hergestellten Nanokapseln wurde bovines Serumalbumin (BSA) eingelagert und *in vitro*-Freisetzungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde für pH 1,4 (simulierter pH im Magen-Darm-Trakt) und pH 6,8 (simulierter extrazellulärer pH) keine ausgeprägte Proteinfreisetzung beobachtet, wohingegen bei pH 6,8 in Kombination mit 10 mM GSH ein schneller Release des BSA gezeigt werden konnte.¹⁰⁹

Der Einfluss von enzymatischen Prozessen spielt außerdem in pathogenen Situationen eine wichtige Rolle. Daher werden Nanocarrier entwickelt, welche auf bestimmte pH/Enzym-, Temperatur/Enzym und Enzym/Enzym-Stimuli reagieren. Von KIM et al. wurde beispielsweise ein *pH/Enzym-responsives* System verwendet, indem das Biopolymer Hyaluronsäure über eine chemische Funktionalisierung mit 3-Diethylaminopropylgruppen (DEAP) versehen wurde. Anschließend konnten Nanopartikel durch Selbstorganisation des hydrophilen Blocks der Hyaluronsäure und der hydrophoben DEAP-Gruppen bei pH 7,4 hergestellt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Partikel durch Protonierung der DEAP-Gruppen infolge von pH-Wertsenkungen auf pH 5,0 destabilisiert werden, sodass eine Freisetzung des eingelagerten Doxorubicins stattfindet. Zusätzlich kann die Hyaluronsäure durch das Enzym Hyaluronidase gespalten werden, um den Doxorubicinrelease um weitere 20 bis 30 % zu steigern. Die DEAP-Hyaluronsäure-Nanopartikel können daher in pathogenen Zellen mit typischen aziden pH-Werten, aber auch in Hyaluronidase-reichen Endosomen degradiert werden.¹¹⁰ *Temperatur/Enzym-responsive* Hydrogele wurden von KURISAWA et al. bereits im Jahr 1998 vorgestellt.¹¹¹ In diesen Arbeiten wurde das thermo-responsive PNIPAAm verwendet, welches im Kapitel 3.2.2 bereits ausführlich diskutiert wurde. Zusätzlich wurde eine Peptidsequenz verwendet, die für die Biodegradabilität des Systems verantwortlich ist.

In vitro-Degradationsstudien mit dem Modellenzym Papain zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust der Hydrogelsubstrate in Abhängigkeit von der Temperatur. Ein anderer Ansatz wurde von GARRIPELLI et al. veröffentlicht, bei dem ein auf Pluronic^{®xiv} basierendes thermo-sensitives Multiblockcopolymer mit einer MMP2-labilen Peptidsequenz, Gly-Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly-Lys-NH₂, versehen wurde. Dadurch konnte neben der Gelierbarkeit bei Körpertemperatur auch eine bioresponsive Degradierbarkeit in Gegenwart von MMP-2 erreicht werden. Mithilfe dieses Systems konnte die Löslichkeit von Paclitaxel gesteigert und eine enzym-abhängige Freisetzung des Antikrebswirkstoffs erzielt werden.¹¹³ *Enzym/Enzym dual-responsive* Nanomaterialien stellen hingegen eine weitere hervorragende Methode dar, um eine Wirkstofffreisetzung in Gegenwart von komplexen pathologischen Bedingungen einzuleiten. Solch ein Ansatz wurde von RADHAKRISHNAN et al. gewählt, indem Mikrokapseln aus dem Arginin-reichen Protein Protamin und dem anionischen Polysaccharid Chondroitinsulfat hergestellt wurden. Dadurch konnte ein „molekulares ODER-Gitter“ erhalten werden, welches entweder in Gegenwart der infektiöserlevanten Enzyme Trypsin (spaltet Protamin) oder Hyaluronidase (spaltet Chondroitinsulfat) degradiert werden kann. Durch die Wahl des Enzyms konnte zudem eine zeitliche Kontrolle der Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes erreicht werden. Eine schnelle Degradation der Kapseln konnte in Anwesenheit von Trypsin über einen Zeitraum von 30 min beobachtet werden, wohingegen eine ähnliche Freisetzung durch Hyaluronidase erst nach 24 h auftrat.⁵⁶ Hyaluronidase-labile bioresponsive Nanomaterialien wurden kürzlich auch von TÜCKING et al. publiziert. Aus Hyaluronsäure und Polymilchsäure (PLA) wurden durch Kupfer-katalysierte Clickchemie Blockcopolymere hergestellt, welche sich in wässrigen Medien zu vesikulären Strukturen selbst organisieren. Die Vesikel dienten zur Detektion von pathogenen Hyaluronidase-exprimierenden Bakterien wie *staphylococcus aureus* und *pseudomonas aeruginosa*. Als weiteres Modellenzym wurde Proteinase K verwendet, um den Farbstoff Fluorescein freizusetzen.¹¹⁴

Dual- oder multi-responsive Drug-Delivery-Systeme bieten den entscheidenden Vorteil, dass sich der Wirkstoff als Folge verschiedener Stimuli freisetzen lässt. Dadurch kann die Umgebung pathogener Situationen effektiver ausgenutzt werden. Vor allem im Hinblick auf relativ geringe Temperatur- oder pH-Wertänderungen in infektiösem Gewebe können durch

^{xiv} Pluronic[®] ist ein Markenname der BASF für nichtionische Tenside, die auch als Poloxamere (Blockcopolymere aus Ethylenoxid und Propylenoxid) bezeichnet werden.¹¹²

die zusätzliche Inkorporation von weiteren Stimuli Wirkstofffreisetzungen spezifischer erfolgen. Mithilfe von Enzym/Enzym-responsiven Drug Delivery Systemen lassen sich zudem je nach Wirkort verschiedene Enzyme adressieren, sodass eine zielgerichtete Behandlung möglich ist. Nichtsdestotrotz sollte bedacht werden, dass durch die Einführung von weiteren Stimuli-responsiven Resten bzw. Monomeren die Komplexizität des Systems erheblich steigt.

3.3 Lösungsansatz

Zur Entwicklung enzymatisch-responsiver Drug-Delivery-Systeme bieten sich verschiedene Strategien an, die vom Anwendungsgebiet und den verwendeten Materialien abhängig sind. Im Rahmen dieser Dissertation wurden intelligente und dynamische Freisetzungssysteme zur Vermeidung Implantat-assoziiierter Infektionen entwickelt, indem die Wirkstofffreisetzung aus einer Nanopartikelbeschichtung als Konsequenz einer inflammatorischen oder infektiösen Situation im Körper angestrebt wird. Ausgehend von dem von POTH verwendetem Chitosan/Natriumtripolyphosphat-System zur Präsentation von biologisch aktivem „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) werden Polysaccharid-Nanopartikel eingesetzt, in denen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen inkorporiert werden können.¹¹⁵ Hierbei werden neben der a) Präparation und Charakterisierung der Nanopartikel, b) die Implementierung als Beschichtungssystem auf Titanoberflächen und c) die Verkapselung und Enzym-responsive Freisetzung von Modellwirkstoffen als Primärziele verfolgt.

Die Herstellung Enzym-labiler Nanopartikel soll durch Gelbildung aus Polysacchariden, wie Chitosan und Alginat, in Kombination mit maßgeschneiderten Peptidlinkern realisiert werden, deren Auswahl in Kapitel 4 detaillierter erörtert wird. Eigenschaften wie hydrodynamischer Durchmesser und Einheitlichkeit der Partikel werden mithilfe Dynamischer Lichtstreuungsmessungen (DLS), Kryo-Rasterelektronenmikroskopie und „nanoparticle tracking analysis“ (NTA) analysiert. Durch Degradationsstudien in Gegenwart entsprechender Proteasen soll die Stabilität der präparierten Suspensionen evaluiert werden. Für den Transfer der Nanopartikelsuspensionen in ein funktionierendes Beschichtungssystem soll eine geeignete Methodik entwickelt werden, die sich durch einfache Durchführbarkeit und gute Reproduzierbarkeit auszeichnet. Die Charakterisierung der Beschichtungen soll durch Ellipsometrie, Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS), Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Röntgenphotoelektronenspektroskopie

(XPS) erfolgen. Durch Stabilitätsuntersuchungen der Beschichtungen in Anwesenheit infektionsrelevanter Enzyme wird die Bioresponsivität der Materialien evaluiert. Zusätzlich soll in Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) die Zellverträglichkeit der Nanopartikelsuspensionen und der –beschichtungen gegenüber humanen Gingivafibroblasten beurteilt werden. In den Verkapselungsexperimenten wird in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) die Eignung der Nanopartikel als Wirkstoffreservoir für Interferon- β (IFN β) und das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) untersucht. In weiteren Experimenten soll zudem eine Freisetzung unter physiologisch relevanten Bedingungen evaluiert werden. Abschließend sollen die gewonnenen Ergebnisse eine Evaluierung der elektrostatisch vernetzten Nanopartikel als Drug-Delivery-System für die gewählten Proteine erlauben.

4. Biopolymer-Nanopartikel

Die Eigenschaften von Biopolymer-Nanopartikeln und ihre Verwendung als Drug-Delivery-Systeme (DDS) wurden bereits in Kapitel 3.1.4 hinreichend erörtert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanogele aus biologischen und semisynthetischen Polymeren in Kombination mit entsprechenden Crosslinkern hergestellt. Die Materialien wurden mithilfe ionotroper Gelierung präpariert, welche auf der Wechselwirkung von entgegengesetzt geladenen Polyionen beruht. Dieser Vorgang kann als Folge der Wechselwirkung von Polyanionen und Polykationen verstanden werden. Als Triebkraft dieses Prozesses wirkt neben der elektrostatischen Anziehung der Polyelektrolyte auch der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Gegenionen.¹¹⁶ Parameter wie Größe, Verteilungsbreite und Oberflächenladung (Zetapotential) der Partikel hängen maßgeblich von den Konzentrationen der Lösungen, dem Mischungsverhältnis, dem Molekulargewicht des Polymers und dem pH-Wert ab.¹¹⁷ Im weiteren Verlauf wird auf die zwei untersuchten Nanopartikelsysteme näher eingegangen.

4.1 Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel

Durch die gute Verfügbarkeit der Nanopartikelkomponenten und den simplen Herstellungsprozess auf Basis der ionotropen Gelierung besitzt das Chitosan/Tripolyphosphat-System ein großes Potential für den Einsatz als DDS. Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel wurden in der Literatur bereits zur Verkapselung von Peptiden,¹¹⁸ Proteinen, pDNA¹¹⁹ und siRNA¹²⁰ verwendet. Im Arbeitskreis wurde das Nanopartikelsystem von POTH etabliert und zur Präsentation von biologisch aktivem BMP-2 eingesetzt. Durch eine simple Beimischung des BMP-2 während des Präparationsprozesses konnte eine Einlagerungseffizienz von über 90 % realisiert werden. Zudem können die Nanopartikel aufgrund ihrer Ladungsverhältnisse auf Titan adsorbiert werden, sodass eine Freisetzung vom Substrat bzw. vom Implantat ermöglicht werden kann. POTH konnte durch den Einsatz des Enzyms Lysozym eine erhöhte Freisetzung des BMP-2 aus den Partikelbeschichtungen beobachten.⁹³ Lysozym kann prinzipiell nicht als direkter Infektionsmarker verstanden werden, da es in nahezu allen Körperflüssigkeiten (Tränenflüssigkeit, Serum, Blut, Sperma etc.) vorkommt. Nichtsdestotrotz konnten jedoch SCHIFFER et al. kürzlich zeigen, dass die Lysozymaktivität in infizierten Wunden aufgrund der erhöhten Keimbelastung deutlich gesteigert ist.¹²¹ Diese Überregulation des Enzyms könnte für den Einsatz in Enzym-responsiven Nanomaterialien ausgenutzt werden.

4.1.1 Chitosan

Chitosan ist ein semisynthetisches Polymer, welches durch alkalische oder enzymatische Deacetylierung von Chitin, einem in Krustentieren, Pilzen und Insekten vorkommenden Polysaccharid, gewonnen werden kann.¹²² Es handelt sich um ein lineares Copolymer, welches gemäß Abbildung 4—1 aus 1,4-verknüpften 2-Acetylamino-2-desoxy- β -D-Glukose–(N-Acetylglukosamin) und 2-Amino-2-desoxy- β -D-Glukose-Einheiten (Glukosamin) aufgebaut ist.¹²³

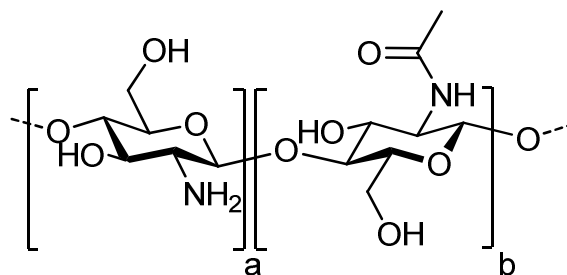


Abbildung 4—1 Strukturformel von Chitosan mit a) Glukosamin- und b) N-Acetylglukosamineinheit.

In der Regel wird jedoch von Chitosan gesprochen, wenn der Deacetylierungsgrad (DDA) über 40-50 % liegt und das Polymer in organischen Säuren löslich ist.¹²⁴ Chitosan verfügt gleichzeitig über zwei Hydroxygruppen (am C3- und C6-Kohlenstoffatom) und eine freie Aminogruppe (am C2-Kohlenstoffatom), welche die Eigenschaften des Polymers maßgeblich beeinflussen. Die verbesserte Löslichkeit gegenüber Chitin kann mit der freien Aminogruppe erklärt werden, die im Säuren protoniert werden kann. Zusätzlich bietet die Amin-Funktionalität eine hervorragende Möglichkeit das Polymer durch eine Amidierung mit verschiedensten Molekülen wie Thiolen, Farbstoffen, Fettsäuren oder auch Cyclodextrinen zu versehen.¹²⁵ Ferner können Reaktionen an den Hydroxygruppen im Chitosan durchgeführt werden, die beispielsweise von NISHI et al. zur Phosphorylierung oder von LILLO et al. zur Carboxylierung des Polymers beschrieben wurden.¹²⁶ Chitosan wird nicht zuletzt aufgrund seiner vielseitigen Modifizierungsmöglichkeiten für diverse Anwendungen benutzt. Dazu zählen neben Hydrogelen und Nanopartikeln für Drug-Delivery-Systeme auch Beschichtungen für Nahrungsmittelverpackungen. Weitere Applikationen in der Fotografie, Kosmetik, Abwasserbehandlung oder als Nahrungsmittelzusatz werden in einem ausführlichen Review von KUMAR vorgestellt.¹²⁷

Chitosan wird häufig als Nanopartikelkomponente wegen seiner geeigneten chemischen und biologischen Eigenschaften verwendet.¹²⁴ Neben der Komplexierung mit Polyanionen wie Natriumtripolyphosphat eignet sich hierbei Chitosan in Hinblick auf einen möglichen *in vivo*-

Einsatz als DDS auch aufgrund seiner hervorragenden Biokompatibilität und Biodegradabilität. Die gute Biokompatibilität des Chitosans geht laut KUMAR et al. und LEEDY et al. auf die strukturelle Ähnlichkeit zu den in der extrazellulären Matrix vorkommenden Glykosaminoglykanen und Hyaluronsäure zurück.¹²⁸ Die enzymatische Degradabilität von Chitosan im menschlichen Körper wurde bereits in den Reviews von DASH et al. und KEAN et al. ausführlich beschrieben.^{124,129} Durch das in nahezu allen Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Tränenflüssigkeit, Wundsekret) vorkommende Enzym Lysozym, kann das Polysaccharid in natürlich vorkommende Zuckereinheiten gespalten werden, welche verstoffwechselt oder ausgeschieden werden können.¹³⁰ Von FREIER et al. wurden Degradationsversuche in Gegenwart von Lysozym an Chitosanfilmen durchgeführt, die eine Abhängigkeit vom verwendeten Deacetylierungsgrad (DDA) illustrieren. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass die enzymatische *in vitro*-Degradation außerhalb von 70 – 30 % DDA erheblich langsamer verläuft als bei einem DDA zwischen 60 – 40 %.¹³¹

4.1.2 Natriumtripolyphosphat

Chitosan kann mit dem Crosslinker Natriumtripolyphosphat (TPP, siehe Abbildung 4—2) in einer ionotropen Gelierung zu Nanopartikeln umgesetzt werden. TPP ist ein linear verknüpftes, kurzkettiges Oligomer, welches zur Gruppe der Polyphosphate gehört.¹³² Das Molekül besteht aus drei aneinander gereihten Orthophosphatgruppen, die durch energiereiche Phosphoanhydridgruppen verknüpft sind.¹³³

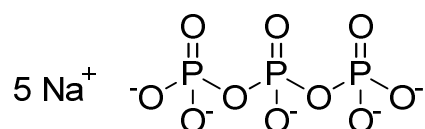


Abbildung 4—2 Strukturformel von Natriumtripolyphosphat.

Natürlich vorkommende anorganische Polyphosphate können in allen Zelltypen beobachtet werden und sind dort beispielsweise bei der zellulären Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) beteiligt.^{134,135} Synthetisch kann TPP in einer Kondensationsreaktion durch das Erhitzen von stöchiometrischen Mengen an Dinatriumphosphat Na_2HPO_4 und Mononatriumphosphat NaH_2PO_4 hergestellt werden.¹³⁶ In Lebensmitteln dienen Polyphosphate neben der Feuchtigkeitsretention und Geruchsunterdrückung auch zur Verbesserung der Emulgierbarkeit.¹³⁵ Des Weiteren besitzen sie einen antibakteriellen Effekt und beugen oxidativen Prozessen vor. TPP wurde

von der FDA als sicher und biokompatibel eingestuft, so dass es mittlerweile in den USA und Europa auch als Lebensmittelzusatz zugelassen (E451) wurde.¹³⁷

4.2 Alginat/Peptid-Nanopartikel

Aufgrund des polyanionischen Charakters von Alginat können in Kombination mit mehrwertigen Kationen wie Chitosan, Calcium- oder Bariumionen potente Drug-Delivery-Systeme auf Basis elektrostatischer Wechselwirkungen präpariert werden.^{138,139} Hierbei ist das Alginat/Chitosan-System der bislang am besten untersuchte Polyelektrolytkomplex für biomedizinische Anwendungen. In zahlreichen Studien konnte die Einlagerung von Substanzen, wie beispielsweise Lysozym¹⁴⁰ oder BSA,¹⁴¹ bestätigt werden. Ferner lieferte auch der Einsatz von Proteinen, wie β -Lactoglobulin,¹⁴² α -Poly-L-Lysin (α PLL)^{143,144} oder Poly-L-Ornithin,¹⁴⁵ als Crosslinker ähnliche Strukturen. Durch die Verwendung von infektionsrelevanten Sequenzen, die in Gegenwart geeigneter Enzyme degradiert werden können, sind auf diese Weise kontrollierte Wirkstofffreisetzungen denkbar.

4.2.1 Alginat

Alginat ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, welches aus den drei marinen Braunalgenarten *laminaria hyperborean*, *ascophyllum nodosum* und *macrocystis pyrifera* extrahiert werden kann.¹⁴⁴ Das Polymer ist das Salz der Alginsäure und besitzt eine lineare Struktur bestehend aus 1,4-verknüpften beta-D-Mannuronsäure- (M) und alpha-L-Guluronsäureeinheiten (G), die willkürlich entlang der Kette verteilt sein können (siehe Abbildung 4—3).^{138,144}

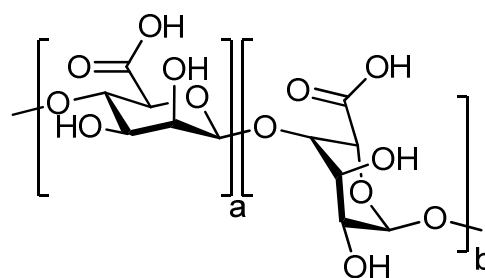


Abbildung 4—3 Strukturformel von Alginat mit a) Mannuronsäure- und b) Guluronsäure.

Durch die freien Carboxylgruppen kann das gut lösliche Natriumalginat mit mehrwertigen Kationen wie Calcium, Barium und Strontiumionen, aber auch Polypeptiden wie PLL geliert werden.^{138,146,147} Dabei sind die Affinitäten der Ionen für die Guluron- und Mannuronsäureeinheiten nicht identisch. Die multivalenten Ionen interagieren bevorzugt mit den sich wiederholenden Guluronsäureresten, sodass sich eine „eierschachtelartige

Struktur“ ergibt, die übereinander gestapelt vorliegt.¹³⁸ Die eigentliche Netzbildung entsteht durch kontinuierlichen Austausch der einwertigen Natriumionen durch mehrwertige Ionen.¹⁴⁸ Durch diese Gelierbarkeit wird Alginat seit mehreren Jahrzehnten als Wundheilungs-, *in vitro*-Zellkulturmaterial und für Geweberegenerierungszwecke verwendet.^{98,146} Zusätzlich dienen Alginathydrogele als DDS für die Verabreichung von Peptiden, Proteinen und Antibiotika.^{147,149} Zur Beurteilung der Biokompatibilität wurden mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt, um einen Einfluss der jeweiligen Zusammensetzung des Alginats zu untersuchen. Es wurde einerseits berichtet, dass Alginat mit hohen Mannuronsäuregehalten immunogen und eine 10-fach höhere Wahrscheinlichkeit für Zytokinproduktion, verglichen mit Alginat mit hohen Guluronsäuregehalten, aufwies,¹⁵⁰ während andere Studien jedoch nur eine geringe bzw. keine Immunantwort bei Alginatmaterialien zeigten.¹⁵¹ Die immunogene Antwort könnte unabhängig von der Zusammensetzung des Alginats sein und eher auf natürliche Kontaminanten wie Schwermetalle, Endotoxine, Proteine und polyphenolische Verbindungen zurückzuführen sein.¹⁵² Daher sollte Alginat als Naturprodukt vor der Verwendung für biomedizinische Interessen gewissenhaft aufgereinigt werden. Speziell aufgereinigtes Alginat als Implantatbeschichtung oder als Gel zog im Tiermodell keinerlei signifikante Fremdkörperreaktion nach sich.¹⁵³ Die enge strukturelle Verwandtschaft zu den Komponenten der extrazellulären Matrix spielt dabei vermutlich ähnlich wie beim Chitosan eine übergeordnete Rolle.

Es sind bislang keine Enzyme im menschlichen Körper bekannt, welche Alginat degradieren können. Dennoch können beispielsweise Calcium-vernetzte Alginathydrogele mit der Zeit durch Austauschprozesse der divalenten Calciumionen gegen im physiologischen Milieu vorkommende Natriumionen aufgelöst werden. Die wasserlöslichen Alginatketten können durch die Nieren ausgeschieden werden, wenn das Molekulargewicht unter 50 kDa liegt.¹⁵⁴ Für längere Alginatketten besteht hingegen keinerlei Möglichkeit zur Metabolisierung, da das in Algen und marinen Wirbellosen vorkommende Enzym Alginatlyase im menschlichen Organismus nicht vorkommt.¹⁵⁵

4.2.2 α -Poly-L-Lysin (α PLL)

Alginathydrogele werden zumeist durch die Zugabe von Alginattröpfchen in millimolar konzentrierte Lösungen von Calcium- oder Bariumionen hergestellt.¹⁴⁴ Um die Stabilität der Partikel zu erhöhen, wird häufig zu einem Alginat-Calciumchlorid-Prägel das in Abbildung 4—

4 gezeigte Homopolypeptid α -Poly-L-Lysin (α PLL) hinzugegeben.^{143,144} Lineares α PLL ist ein synthetisches Polykation, welches durch eine Ringöffnungspolymerisation (ROMP) von L-Lysin- N^{ϵ} -Carbobenzoxy- N^{α} -Carboxyanhydrid hergestellt werden kann. Der Einsatz von Übergangsmetall-basierten Initiatoren führt zu Poly(N^{ϵ} -Carboxybenzoxy-L-Lysin) mit einem definierten Molekulargewicht und einer niedrigen Polydispersität. Durch anschließende Entschützung kann α PLL erhalten werden.¹⁵⁶

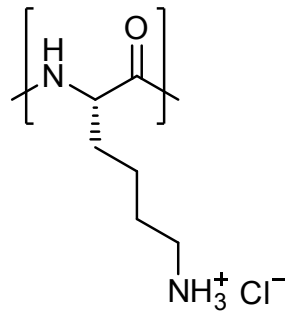


Abbildung 4—4 Strukturformel von α -Poly-L-Lysin Hydrochlorid.

Das wasserlösliche α PLL wird aufgrund seiner kationischen Ladung neben der Beschichtung von Zellkulturplastiken auch für Drug Delivery Anwendungen und Zellmikroenkapselungen verwendet.^{143,144,157} Obwohl bereits ausführlich gezeigt werden konnte, dass α PLL die Zelladhäsion und das Gewebewachstum fördert, wurden in einzelnen Studien immunogene Effekte festgestellt.¹⁵⁸ Nichtsdestotrotz wurde α PLL als Modellcrosslinker neben seiner guten Wasserlöslichkeit und seinem kationischen Charakter auch aufgrund seiner Degradabilität durch Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin oder Proteinase K ausgewählt.^{159,160}

4.2.3 NITEGE/NVTEGE

Zusätzlich zu dem Homopolypeptid α PLL wurden zwei eigens für diese Arbeit entwickelte Peptide untersucht. Die vollständige Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode in Abbildung 4—5 dargestellt. Des Weiteren sind einzelne relevante Fragmente des Peptids mit arabischen Ziffern gekennzeichnet, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

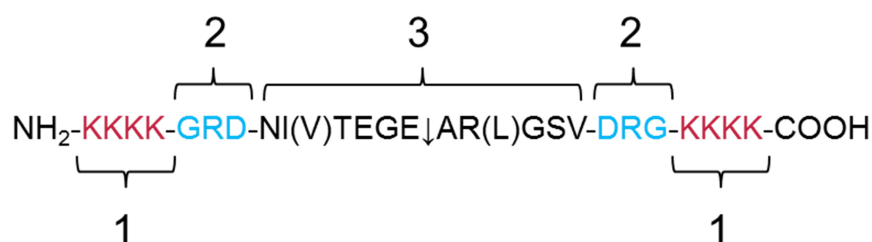


Abbildung 4—5 Aminosäuresequenz der Aggrecanase-labilen Crosslinker im Einbuchstabencode mit K – Lysin, G – Glycin, R – Arginin, D – Asparaginsäure, N – Asparagin, I – Isoleucin, V – Valin, T – Threonin, E – Glutaminsäure, A – Alanin, L – Leucin, S – Serin. Die Aminosäurevariationen der murinen Aggrecanase-Spaltsequenz sind in Klammern angegeben.

In der Abbildung 4—5 sind links das N- und rechts das C-terminale Ende der Aminosäuresequenz dargestellt. Direkt verknüpft befinden sich an jedem Ende jeweils vier Lysineinheiten (1), welche ähnlich wie beim α PLL als kationische Ladungsträger fungieren. Über diese Lysine kann die ionotrope Gelierung mit dem betreffenden Polygegenion wie Alginat ermöglicht werden. Der GRD- bzw. DRG-Abschnitt (2) im Molekül dient als Spacerregion zwischen den eben angesprochenen Lysinresten (1) und der eigentlichen Spaltsequenz (3). Hierbei wurde darauf geachtet, dass beide Triplets eine gewisse Ähnlichkeit zu dem Zellbindungsmotiv RGD besitzen, welches in späteren Studien eventuell zum Einsatz kommen könnte, wenn eine erhöhte Zelladhäsion erwünscht wird. Die verwendeten Sequenzen sind in dieser Hinsicht allerdings nicht aktiv. Die Aminosäuresequenz (3) wurde so ausgewählt, dass sie als Spaltstelle (\downarrow) für die infektionsrelevante Protease Aggrecanase^{xv} dienen kann. Dabei wurde sowohl für die humane (NITEGE \downarrow ARGSV) als auch für die murine Aggrecanase (NVTEGE \downarrow ALGSV) jeweils ein Peptid mithilfe der Festphasenpeptidsynthese (engl. solid phase peptide synthesis = SPPS) hergestellt.^{xvi}

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Spaltsequenzen lediglich in zwei Aminosäuren unterscheiden. Neben Aggrecanase können die Peptide zudem auch durch Enzyme gespalten werden, welche weniger spezifisch wirken. So ist beispielsweise Trypsin in der Lage zusätzlich zu der C-terminalen Spaltung von Lysin (siehe Kapitel 4.2.2) auch Arginin am C-terminalen Ende zu hydrolysieren.¹⁶¹ Somit besitzt das Peptid NITEGE \downarrow ARGSV (humane Aggrecanase-Spaltsequenz) insgesamt 10 Spaltstellen, während NVTEGE \downarrow ALGSV (murine Aggrecanase-Spaltsequenz) eine Stelle weniger besitzt, da ein Arginin durch ein Leucin ausgetauscht ist (siehe Abbildung 4—6). Neben Trypsin ist beispielsweise auch das im Mikroorganismus *Bacillus thermoproteolyticus* produzierte Thermolysin zur Spaltung der Peptide befähigt.¹⁶² Thermolysin hydrolysiert bevorzugt Peptidbindungen N-terminal zu hydrophoben Aminosäuren mit großen Seitenketten wie Isoleucin (I), Leucin (L), Valin (V) und Phenylalanin (F).¹⁶² Dieses Enzym spaltet somit in der vorliegenden Aminosäuresequenz deutlich spezifischer als beispielsweise Trypsin. So gibt es in der humanen Aggrecanase-Spaltsequenz aus Abbildung 4—6 nur zwei Hydrolysestellen,

^{xv} Aggrecanase ist ein infektionsrelevantes Enzym, auf dessen Bedeutung im Kapitel 4.2.4 detailliert eingegangen wird.

^{xvi} Die Aggrecanase-labilen Peptide wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) hergestellt.

während bei der murinen Spaltsequenz (NVTEGE↓ALGSV) aufgrund des Austausches eines Arginins durch Leucin drei Spaltstellen möglich sind.

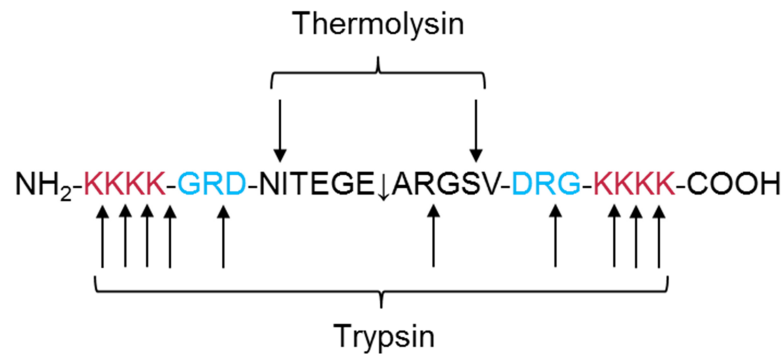


Abbildung 4—6 Darstellung der Spaltstellen für Thermolysin und Trypsin anhand der humanen Aggrekanase-Spaltsequenz NITEGE↓ARGSV.

4.2.4 Aggrekanase

Das Hauptsubstrat der Aggrekanase ist das Proteoglycan Aggrekan, welches mit seiner Masse von 3.000 kDa etwa 100 Glykosaminoglykan-Einheiten (GAG) enthält. Aggrekan gehört zu den wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) im Gelenkknorpel und zeichnet dort zusammen mit kollagenen Fibrillen für die Elastizität verantwortlich.¹⁶³ Diese Kompressionsfähigkeit resultiert aus der hohen Wasseraufnahmekapazität des Aggrekans.¹⁶⁴ Das in Abbildung 4—7 schematisch dargestellte Protein besitzt zwei globuläre Domänen, G1 und G2, am N-terminalen Ende und eine globuläre Domäne G3 am C-Terminus.

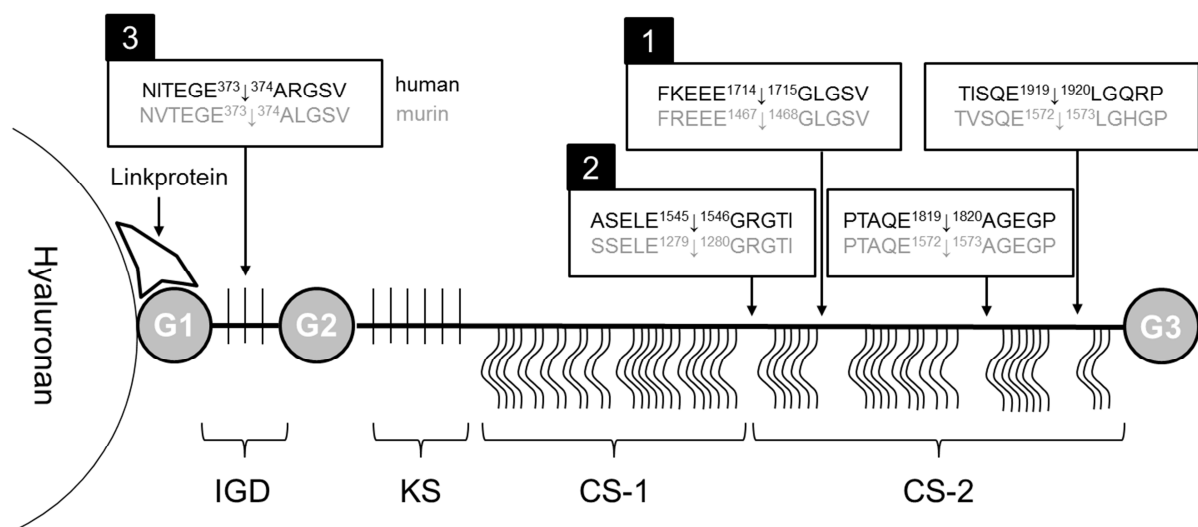


Abbildung 4—7 Schematische Darstellung der Struktur des Aggrekanproteins mit den globulären Domänen G1, G2 und G3 und entsprechenden Aggrekanase-Spaltstellen. Das Kernprotein ist mit Chondroitinsulfat- (CS) (wellige Linien) und Keratansulfatketten (KS) (gerade Linien) substituiert. Die Spaltstellen sind für humane in schwarz und murine Aggrekanase in grau gezeigt. Die arabischen Ziffern über den Sequenzen geben die bevorzugte Spaltreihenfolge der Aggrekanase an (IGD – Interglobuläre Domän).

Die Aminosäuresequenz zwischen G2 und G3 ist mit Chondroitinsulfat- (CS) und Keratansulfatketten (KS) substituiert, welche weiterhin in CS-1- und CS-2-Domänen und

einer KS-reichen Region unterteilt sind. Zwischen G1 und G2 befindet sich die etwa 150 Aminosäuren lange interglobuläre Domäne (IGD), die N-terminal mit der globulären Domäne G1 hochspezifisch an das in der EZM vorkommende Hyaluronan binden kann. Zusätzliche Stabilisierung wird durch ein Linkprotein vermittelt. Die Aggregatbildung mit Hyaluronan spielt physiologisch eine sehr bedeutende Rolle, da sie das Auflösen von Aggrecan im Kollagen Netzwerk verhindert.¹⁶⁵ Die Degradation von Aggrecan gilt als essentieller pathologischer Schritt im frühen Stadium der Osteoarthritis und ist der Hauptgrund für den chronischen Verlust von Knorpelsubstanz. Dieser als Aggrecanolyse bezeichnete Abbau wird sowohl durch Aggrecanase als auch durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) verursacht. Bislang wurden zwei Aggrecanase-Isoformen (ADAMTS-4 und ADAMTS-5) entdeckt, welche zu der „a disintegrin and metalloproteinase with thromospondin motifs“ (ADAMTS) Proteinfamilie gehören und hauptsächlich für den Abbau von Aggrecan verantwortlich sind.¹⁶⁵ Obwohl theoretisch viele Spaltungen entlang des Aggrecanmoleküls denkbar wären, liegt die kritischste Spaltstelle in der IGD zwischen den globulären Domänen G1 und G2. Infolge dieser Hydrolyse wird der Glykosaminoglykan-reiche C-Terminus freigesetzt, der für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels relevant ist.^{163,165} Die Spaltung der Glu³⁷³—³⁷⁴Ala-Bindung in der IGD wurde bereits weitgehend untersucht und gilt als Aktivitätsmarker in Menschen und Tieren. LOHMANDER et al. konnten anhand einer Sequenzanalyse in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis nachweisen, dass große GAG-haltige Aggrecanfragmente mit der N-terminalen Aminosäuresequenz Ala-Arg-Gly-Ser (ARGS) präsent sind.¹⁶⁶ Dadurch konnte eindeutig bestätigt werden, dass die Spaltstelle in der IGD sowohl von humaner als auch von muriner Aggrecanase degradiert werden kann. Glu³⁷³—³⁷⁴Ala ist jedoch nicht die bevorzugte Spaltstelle im Aggrecan. ADAMTS-4 und ADAMTS-5 hydrolysieren im menschlichen Organismus vorrangig die Peptidbindungen von vier weiteren Aminosäurepaaren zwischen den globulären Domänen G2 und G3. Dazu gehören Glu¹⁵⁴⁵—¹⁵⁴⁶Gly, Glu¹⁷¹⁴—¹⁷¹⁵Gly, Glu¹⁸¹⁹—¹⁸²⁰Ala und Glu¹⁹¹⁹—¹⁹²⁰Leu.¹⁶⁵ Die Spaltsequenzen der murinen Aggrecanasen sind dabei gemäß Abbildung 4—7 hinsichtlich der Aminosäuresequenz und der Stelle im Aggrecan deutlich verschieden.¹⁶⁷ Da eine Hydrolyse der Glu³⁷³—³⁷⁴Ala-Bindung in der IGD den größtmöglichen Schaden nach sich zieht und die Spaltsequenzen der humanen und der murinen Aggrecanase eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, wurden die im vorherigen Kapitel vorgestellten Peptidcrosslinker NITEGE↓ARGSV (human) und NVTEGE↓ALGSV (murin) verwendet. Damit konnte eine

Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinsichtlich Partikelbildung und Degradationsexperimenten gewährleistet werden.

4.3 Interferon- β (IFN β)

Interferone (IFNs) sind kurze, zumeist glykosylierte Proteine, welche antivirale, antiproliferative und immunomodulatorische Wirkungen besitzen.¹⁶⁸ 1957 wurden Interferone erstmals von ISAACS und LINDEMANN als Faktoren beschrieben, welche als Folge von Virusinfektionen in den Zellen gebildet werden und dort bei der Replikation des Virus „interferieren“. ¹⁶⁹ Mittlerweile werden mit IFN α , IFN β und IFN γ drei verschiedene Klassen von Interferonen eingeteilt, welche sich strukturell, biochemisch und in ihren antigenen Eigenschaften unterscheiden.¹⁷⁰

Im Verlauf einer viralen Infektion, beispielsweise bei einer Hepatitisserkrankung, wird als Abwehrmechanismus der Zellen gemäß Abbildung 4—8 binnen weniger Stunden über eine Reaktionskaskade (RIG-I und IPS-I) Interferon freigesetzt. Die gebildeten Interferone sind in der Lage entweder parakrin (auf andere Zellen) oder autokrin (auf dieselbe Zelle) eine weitere Reaktionskaskade (JAK/STAT-Signalweg) zu initiieren, die zur Bildung von so genannten „Interferon-stimulierenden Genen“ (ISG) führen. Die ISGs können letztlich die Expression verschiedener Gene bewirken, welche die Synthese von speziellen Proteinen einleiten und auf diese Weise die viralen Infektionen in den Zellen zurückdrängen können.¹⁷⁰

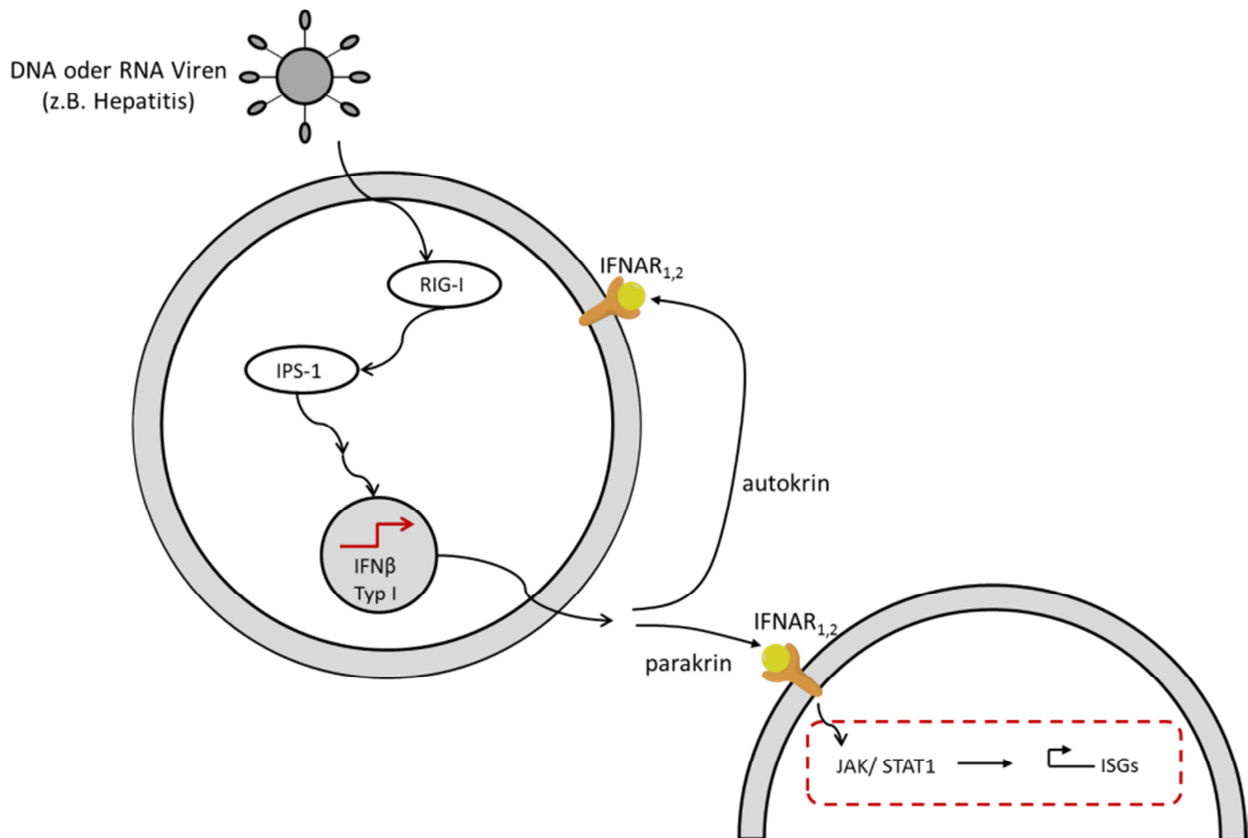


Abbildung 4—8 Schematische Darstellung der Expression von IFNβ infolge einer Virusinfektion.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde IFNβ als Modellwirkstoff bei der Verkapselung und Freisetzung aus den CS/TPP- und Alginat/Peptid-Nanopartikeln ausgewählt. Hierfür war die gute Verfügbarkeit des Proteins entscheidend, welches im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) rekombinant hergestellt wird. Zudem wurde im HZI ein Nachweissystem etabliert, mit dem geringste Mengen an IFNβ sensitiv nachgewiesen werden können. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt dabei über die Zelllinie Mx2Luc2, welche einen IFNβ-induzierbaren Mx-Promoter enthält. Dadurch kann in Abhängigkeit von der IFNβ-Konzentration das Protein Luciferase produziert werden, welches in der Folge durch Zugabe des entsprechenden Substrates Luciferin quantitativ bestimmt werden kann. Somit wurde ein Nachweissystem verwendet, mit dem indirekt die Konzentration an IFNβ *in vitro* bestimmt werden kann.¹⁷¹

Zusätzlich besteht im HZI die Möglichkeit eine *in vivo*-Biolumineszenzmessung mithilfe von speziellen Mx2Luc-Reporter-Mauszelllinien durchzuführen (siehe Abbildung 4—9). Damit könnte die Freisetzung von IFNβ aus injizierten oder beschichteten Nanopartikelformulierungen beobachtet werden.

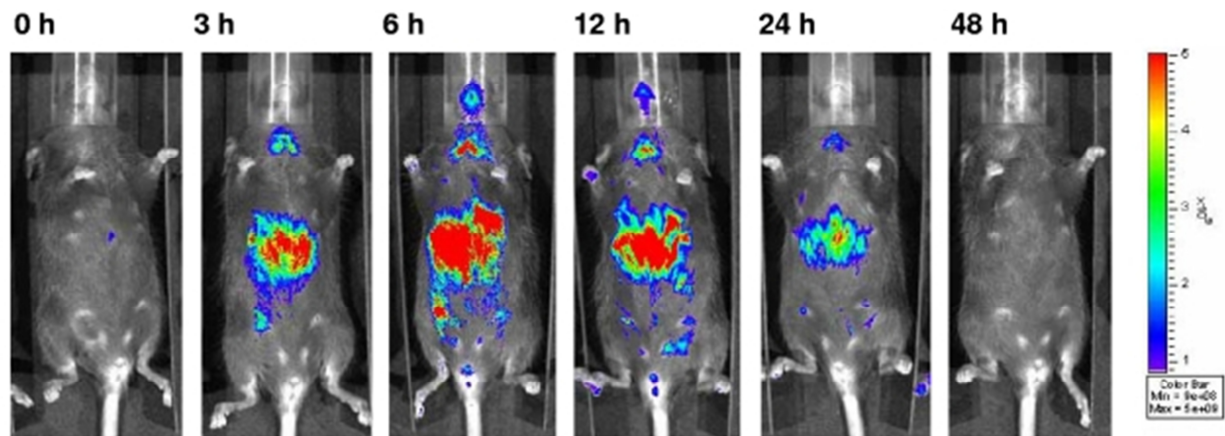
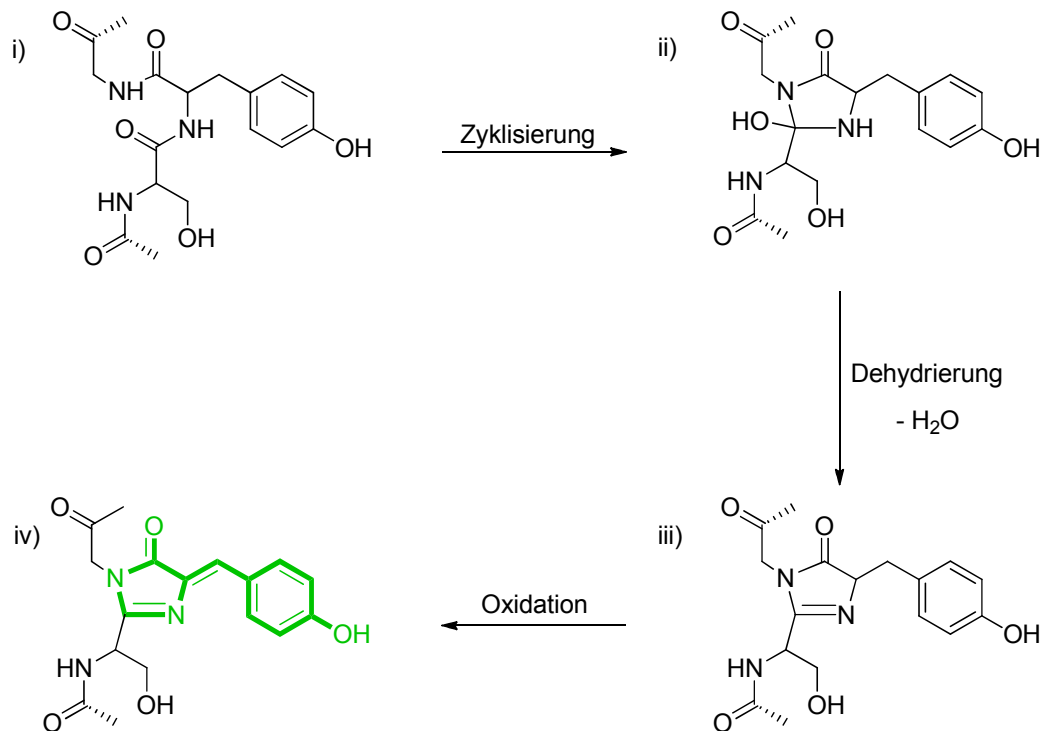


Abbildung 4—9 IFN-Antwort *in vivo*. Gesamtkörperimaging von repräsentativen Mx2Luc-Reporter-Mäusen nach der Injektion von 1.000 Units IFN β .¹⁷¹

4.4 “enhanced green fluorescent protein” (eGFP)

Das „green fluorescent protein“ (GFP) ist ein biologisches Detektionsmolekül, das 1962 erstmals von SHIMOMURA in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde.¹⁷² Die Qualle besitzt ein Licht-emittierendes System, welches auf dem biolumineszenten Protein Aequorin beruht. In Anwesenheit von Calciumionen sendet Aequorin blaues Licht aus, das in der Folge zur Anregung von GFP führt. Die daraus resultierende Fluoreszenz basiert auf einem Fluorophor, welches autokatalytisch zwischen den Aminosäureresten 65-67, Serin-Tyrosin-Glycin, gebildet wird. Die in Reaktionsschema 4-1 gezeigten Reaktionsschritte führen ausgehend vom i) Tripeptid Serin-Tyrosin-Glycin durch eine schnelle Zyklisierung zu einem ii) Imidazolin-5-on-Zwischenprodukt. Durch eine Dehydrierungsreaktion, in Form der Freisetzung von Wasser, wird ein iii) Imidazol-Zwischenprodukt gebildet, woraus sukzessive nach einer Oxidationsreaktion die iv) *p*-Hydroxybenzylimidazol-Struktur entsteht. Die entstehende Doppelbindung trägt zur Verknüpfung der beiden π -Systeme bei. Daraus bildet sich ein größeres konjugiertes System, wodurch die Stabilität des Fluorophors erhöht wird.¹⁷³

**Reaktionsschema 4-1**

Reaktionsverlauf zur Bildung des Fluorophors bei dem „green fluorescent protein“ (GFP) mit i) dem anfänglichen Tripeptid Serin-Tyrosin-Glycin, ii) der Bildung der Imidazolin-Struktur durch intramolekulare Zyklisierung, iii) der Dehydrierung zum Imidazol und iv) der Entstehung des *p*-Hydroxybenzylimidazols, welches durch die Absorption von blauem Licht grünes Licht emittiert.

Die zentrale Bedeutung des GFPs in der Biologie und Biotechnologie wird durch die Fusionierung beziehungsweise Inkorporierung in eine Vielzahl von biologischen Systemen offensichtlich. Auf diese Weise fungiert GFP als Markerprotein und wurde seit seiner Entdeckung unter anderem zur Untersuchung von Genexpressionen,¹⁷⁴ zellulären Lokalisierungen,¹⁷⁵ Proteinmobilitäten¹⁷⁶ und intrazellulären Transportprozessen¹⁷⁷ eingesetzt.

Mittlerweile werden mit den „enhanced“-Varianten vermehrt verbesserte GFPs verwendet, deren Fluoreszenzeigenschaften durch die gezielte Einführung von Mutationen erheblich optimiert werden konnten. In dem in diesem Zusammenhang entwickelten „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) konnte im Vergleich zu dem originalen Wild-Typ-GFP durch die ausgeprägtere Proteinfaltungseffizienz bei 37 °C das Fluoreszenzsignal beachtlich gesteigert werden. Weiterhin besitzt eGFP einen einzelnen Anregungspeak bei 490 nm und wurde für die Expression in Säugetieren optimiert. Aufgrund dieser Vorteile gehört eGFP mittlerweile zu den am weitest verbreiteten Varianten des ursprünglichen GFPs.¹⁷⁸

5. Grundlagen der Analytik

5.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)¹⁷⁹

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonen-Korrelations-Spektroskopie (engl.: photon correlation spectroscopy, PCS) genannt, ist eine leistungsfähige analytische Methode zur Bestimmung von Diffusionsprozessen gelöster Moleküle und kolloidaler Partikel. Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Medium, so wird die Energie des eintreffenden Primärstrahls durch Absorptions- oder Streuprozesse in der Regel erniedrigt. Bei der DLS werden Dichtefluktuationen ausgenutzt, die durch die Streuung der monochromatischen, kohärenten Strahlung des Lasers am reinen Lösungsmittel, gelösten Makromolekülen oder dispergierten Partikeln entstehen. Die BROWN'sche Molekularbewegung führt zu einer willkürlichen Bewegung der Partikel in alle drei Raumrichtungen. Zusammen mit dem DOPPLER-Effekt, der für die Frequenzverschiebung des Streulichts verantwortlich zeichnet, resultieren Fluktuationen der gemessenen Streulichtintensität.

Das Lichtstreuverhalten von Partikeln hängt im Allgemeinen stark von ihrer Größe ab und nimmt mit der Partikelgröße exponentiell zu. Für Punktstreuer, auch RAYLEIGH-Streuer genannt, bei denen der Durchmesser deutlich kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Pulses ist, nimmt die Streulichtintensität etwa mit der sechsten Potenz des Durchmessers zu. Diese Abhängigkeit ist für größere Streuer (außerhalb des RAYLEIGH-Bereichs) etwas abgeschwächt, zeigt aber, dass ein Partikel mit einem Durchmesser von 1.000 nm eine ungefähr Millionen-fach größere Streuintensität eines 100 nm großen Partikels besitzt. Für die in Abbildung 5—1 dargestellte Partikelgrößenverteilung lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Anzahl an 100 nm großen Partikeln, trotz viel geringerer Intensität, deutlich größer ist als die Zahl der 1.000 nm großen Partikel. Ferner lässt sich der Peak im Mikrometerbereich, der für etwaige Kontaminationen wie Staubteilchen typisch ist, von der Partikelzahl gesehen nahezu vernachlässigen.

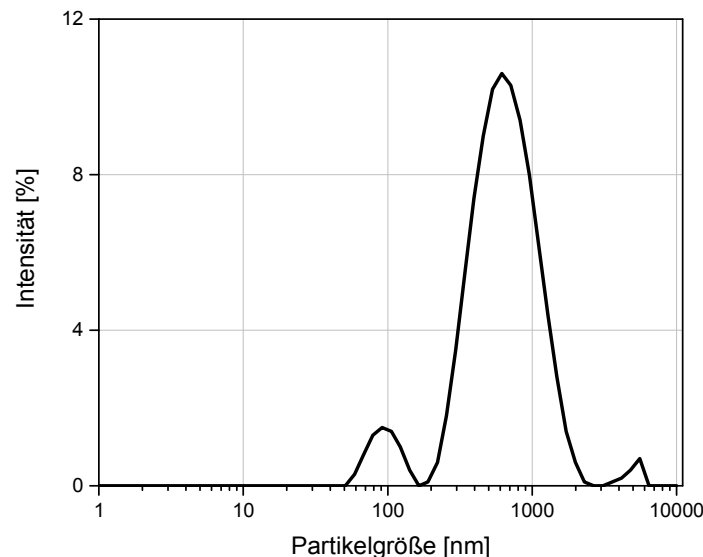


Abbildung 5—1 Darstellung der Partikelgrößenverteilung einer Suspension mit einem hohen Polydispersitätsindex.

Aus der in Abbildung 5—1 gezeigten Abhängigkeit der Streulichtintensität von der Partikelgröße wird der Nachteil der Dynamischen Lichtstreuung offensichtlich. Die Analyse von kleinen neben großen Partikeln ist in polydispersen Proben nur schwer durchzuführen, bei der im Extremfall kleine Partikel komplett vom Streusignal großer Partikel maskiert werden und somit nicht detektiert werden können. Bei der quantitativen Analyse von Proteinaggregaten (< 0,01 % Gewichtsprozent) neben Monomeren hingegen wird dieser Nachteil der Methode gezielt ausgenutzt.

In den nachstehenden Kapiteln wird die Dynamische Lichtstreuung anhand des Geräts Zetasizer Nano ZS von MALVERN INSTRUMENTS erläutert, welches im Laufe des Promotionsvorhabens zur Charakterisierung der Partikelsuspensionen hinsichtlich Partikelgröße und Zetapotential verwendet wurde.

5.1.1 Aufbau: Zetasizer Nano ZS¹⁷⁹

In Abbildung 5—2 ist der schematische Aufbau des Zetasizers Nano ZS dargestellt. Bei einer Partikelgrößenbestimmung wird der Primärstrahl eines 633 nm He-Ne-Lasers über verschiedene optische Komponenten und einen „Intensitätsregler“ in die Messzelle geleitet. Dieser regelt die Intensität des Lasers, damit es am APD-Detektor (APD: avalanche photodiode detector) nicht zu einer Übersättigung bei zu hoher Intensität oder zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei zu niedriger Intensität kommt. Grundsätzlich verstärkt der Intensitätsregler bei zu gering konzentrierten Proben die Intensität. Einhergehend mit der Zunahme der Konzentration der betrachteten Probe, wird mehr Streulicht detektiert und die Intensität wird sukzessive herunter geregelt.

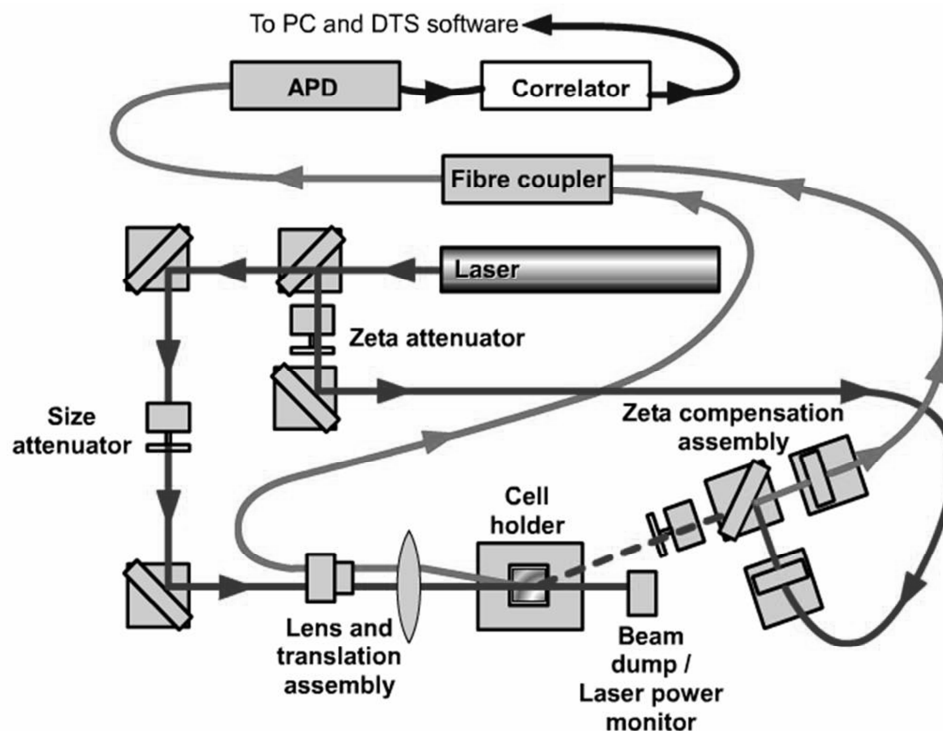


Abbildung 5—2 Strahlengang des Zetasizer Nano ZS von Malvern.¹⁷⁹

Das an den Partikeln gestreute Licht wird in der Folge durch Rückstreutechnik bei $174,65^\circ$ (wässrige Medien) erfasst und an den APD weitergegeben. Die Rückstreudetektion bietet den Vorteil, dass möglichst nahe am Mehrfachstreuminimum von 180° gemessen werden kann. Dadurch können die Streueffekte von verhältnismäßig großen Kontaminanten wie Staubteilchen weitestgehend vermieden werden, da diese Teilchen typischerweise in die Vorwärtsrichtung streuen.

Die Intensitätsänderungen werden anschließend mit einem digitalen Korrelator analysiert, der eine Autokorrelationsfunktion erstellt, die den Diffusionskoeffizienten enthält. Abschließend erfolgt die Übermittlung der Daten an die Software. In den folgenden Absätzen werden einerseits die Partikelgrößenbestimmung und andererseits die Messung des Zetapotentials durch DLS eingehender erläutert.

5.1.2 Bestimmung der Partikelgröße¹⁷⁹

Partikelgrößenmessungen mittels DLS beruhen prinzipiell auf der Intensitätsfluktuation der Streustrahlung der betrachteten Partikel, da sich die Abstände der Streuzentren aufgrund der BROWN'schen Molekularbewegungen kontinuierlich ändern. Daraus resultiert eine zeitabhängige Interferenz des Streulichts zwischen zwei benachbarten Streuzentren. Zusammen mit dem DOPPLER-Effekt, der für die Frequenzverschiebung des Streulichts verantwortlich zeichnet, resultieren auf diese Weise Fluktuationen der gemessenen

Streulichtintensität. Von großer Relevanz ist die Tatsache, dass diese Intensitätsänderungen direkt mit der Geschwindigkeit, und damit der Größe, der betrachteten Partikel zusammenhängen. Aus der Dynamik der zu untersuchenden Teilchen, lassen sich demnach Informationen über die Größe und Form der Partikel ableiten. Gemäß Abbildung 5—3 bewegen sich größere Partikel langsamer im Streumedium, was zu einer langsameren Intensitätsfluktuation führt. Im Gegensatz dazu ist die Geschwindigkeit der Bewegung bei kleinen Partikeln erheblich größer, woraus eine schnelle Intensitätsänderung resultiert.

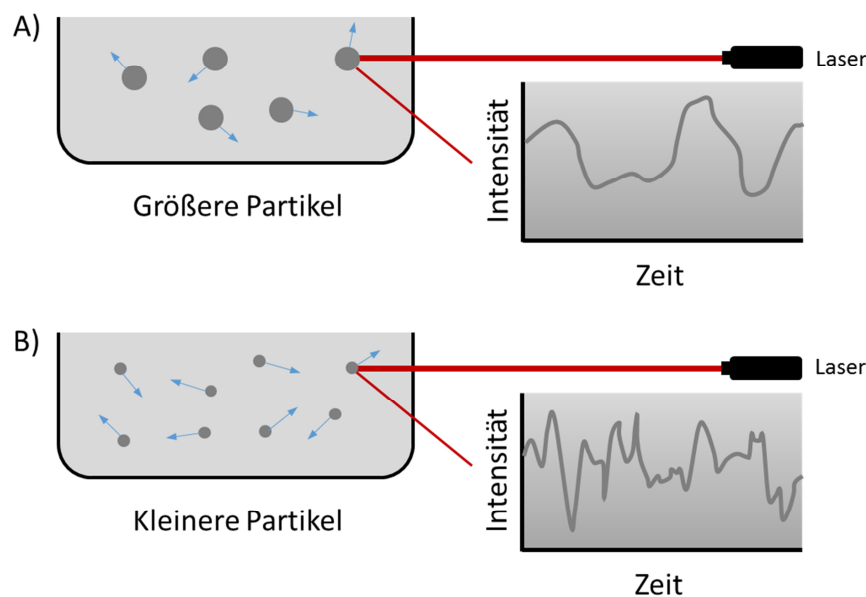


Abbildung 5—3 Hypothetische dynamische Lichtstreuung zweier Proben und die resultierende Intensitätsverteilung: A) größere Partikel und B) kleinere Partikel.

Anschließend wird mithilfe eines Korrelators eine Autokorrelationsfunktion erstellt, um die Intensitätsänderung quantitativ und hoch aufgelöst zu erfassen. Dabei wird die zum Zeitpunkt t erhaltene Intensität $I(t)$ mit der Intensität $I(t + \tau)$ vom Zeitpunkt $(t + \tau)$ verglichen. Wenn τ einen kleinen Wert besitzt, dann lassen sich die Intensitäten nicht unabhängig voneinander betrachten, sondern sie korrelieren miteinander. Die Korrelation gilt damit als Maß für die zurückgelegte Wegstrecke des Partikels. Werden große, langsame Teilchen betrachtet, nimmt die Korrelation auch relativ langsam ab. Entgegengesetzt verläuft es bei der Untersuchung von kleinen Partikeln, die eine hohe Geschwindigkeit aufweisen, was damit auch einen schnellen Abfall der Korrelation nach sich zieht. In Abbildung 5—4 ist beispielhaft ein Autokorrelogramm dargestellt. Der Kurvenverlauf des Graphen gibt bereits Aufschluss über wichtige Charakteristika der untersuchten Probe. Größen wie Partikeldurchmesser (1) und Polydispersitätsindex (2) können direkt über den Zeitpunkt

beziehungsweise die Steilheit der Abnahme des Graphen ermittelt werden. Die Qualität der Messung (3) kann anhand der Peaks der Grundlinie beurteilt werden, die auf die Anwesenheit von Aggregaten oder Staubeilchen hinweisen. Der Polydispersitätsindex (PDI) beschreibt die Verteilungsbreite der Partikelgröße einer untersuchten Probe und variiert zwischen 0 und 1. Dabei tendiert der Wert gegen 0 für engverteilte, streng monodisperse Partikelsysteme, während Werte zwischen 0,5 und 1 für eine polydisperse, breite Verteilung stehen.

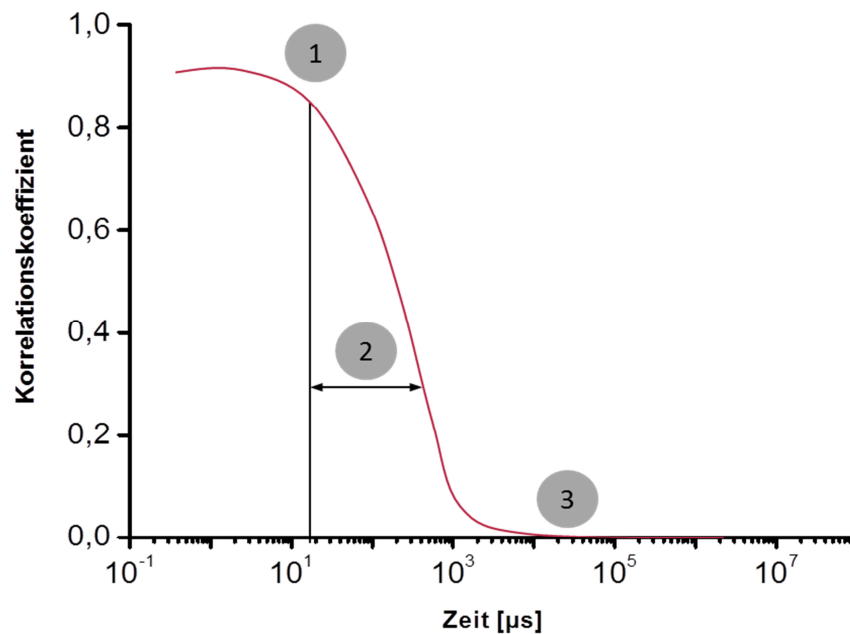


Abbildung 5—4 Autokorrelationsfunktion einer dynamischen Lichtstreuung mit Informationen über 1) den Partikeldurchmesser, 2) den Polydispersitätsindex und 3) die Qualität der Messung.

Die mathematische Betrachtung der Autokorrelationsfunktion ist in der folgenden Gleichung 1 angegeben und bezieht sich ausschließlich auf kugelförmige, monodisperse Teilchen, welche untereinander keinerlei Wechselwirkungen zeigen. Hierbei beschreibt D den translatorischen Diffusionskoeffizienten, t die Messzeit und q den Streulichtvektor.

$$g(t) = e^{-Dq^2t} \quad \text{Gleichung 1}$$

Das Primärergebnis der DLS ist die Kenntnis des Diffusionskoeffizienten der untersuchten Partikel, der mit der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen als Folge der BROWN'schen Molekularbewegung korreliert ist. Die Teilchenbewegung und der daraus erhaltene Diffusionskoeffizient sind stark temperaturabhängig, sodass ein genaues Einhalten der Temperatur bei der Messung unerlässlich ist. Neben der Thermik sollten makroskopische Bewegungen wie Konvektion oder Sedimentation vermieden werden, da diese Vorgänge die BROWN'sche Bewegung beeinflussen und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen

würden. Aus dem translatorischen Diffusionskoeffizienten, der aus der Korrelationsfunktion bestimmt wird, mithilfe der STOKES-EINSTEIN-Gleichung (Gleichung 2) der hydrodynamische Durchmesser der Partikel erhalten werden.

$$d(h) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 2}$$

Hierbei steht k_B für die Boltzmann-Konstante, T für die Temperatur und η für die dynamische Viskosität der Partikellösung. Die STOKES-EINSTEIN-Beziehung ist jedoch nur für einen kompakten sphärischen Partikel in einer NEWTON'schen Flüssigkeit gültig. Werden andere Morphologien betrachtet, so sollte diese Gleichung lediglich als Näherung verstanden werden.

5.1.3 Bestimmung des Zetapotentials¹⁷⁹

Neben der Partikelgröße kann mit dem Zetasizer auch die Oberflächenladung der Partikel, das Zetapotential ζ , charakterisiert werden. Mithilfe des Zetapotentials können die elektrokinetischen Eigenschaften von Partikeln bestimmt und Aussagen über die Stabilität von kolloid-dispersen Systemen getroffen werden. Zur besseren Verständlichkeit soll anhand von Abbildung 5—5 die Bildung der elektrochemischen Doppelschicht bei einem negativ geladenen Partikel und das sich daraus ergebende Zetapotential erläutert werden. Liegen anionische Partikel im betrachteten Medium vor, so kommt es zur Adsorption einer Schicht aus positiv geladenen Ionen. In diesem als Sternschicht bezeichneten Bereich existiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem Potential und dem Abstand von der Partikeloberfläche. Durch die Hydrathülle und der damit verbundenen Größe der Ionen kann nur eine definierte Anzahl an die Teilchenoberfläche adsorbieren. Aus diesem Grund kann nicht die komplette Ladung des Partikels durch die Anlagerung von positiven Ionen direkt kompensiert werden. Daher umgeben weitere Gegenionen als „diffuse Wolke“ die Partikeloberfläche. Diese diffuse Schicht wird nach seinen Entdeckern auch GOUY-CHAPMAN-Schicht genannt und besteht im Gegensatz zur Sternschicht nicht aus fixierten, sondern aus frei beweglichen Gegenionen. Wie im Potentialverlauf in Abbildung 5—5 zu erkennen, ist die Konzentration an positiv geladenen Ionen in geringem Abstand zur Partikeloberfläche noch recht hoch. Wird der Abstand jedoch vergrößert, so nimmt die Konzentration an Kationen ab, während vermehrt Anionen auftreten. Die Konzentrationen der betrachteten Ionen ändern sich so lange, bis es zum Ladungsausgleich kommt. Dort endet die GOUY-CHAPMAN-Schicht und das Potential ist auf null abgefallen.

Aufgrund von Diffusionsbewegungen der Partikel im Dispersionsmedium kommt es zu Reibungs- und Scherkräften, die einen Teil der nicht fixierten, beweglichen Ionen der GOUY-CHAPMAN-Schicht abscheren. Der an dieser elektrokinetischen Scherebene abgestreifte Teil führt zu einem Ladungsungleichgewicht in der äußeren Schicht. In der Folge entsteht eine Potentialdifferenz an der Scherebene, da die abgestreiften Gegenionen die negative Ladung des Partikels nicht mehr kompensieren können. Diese Potentialdifferenz wird als Zetapotential ζ bezeichnet, und wird bei maximaler Abstreifung der GOUY-CHAPMAN-Schicht Sternpotential genannt.

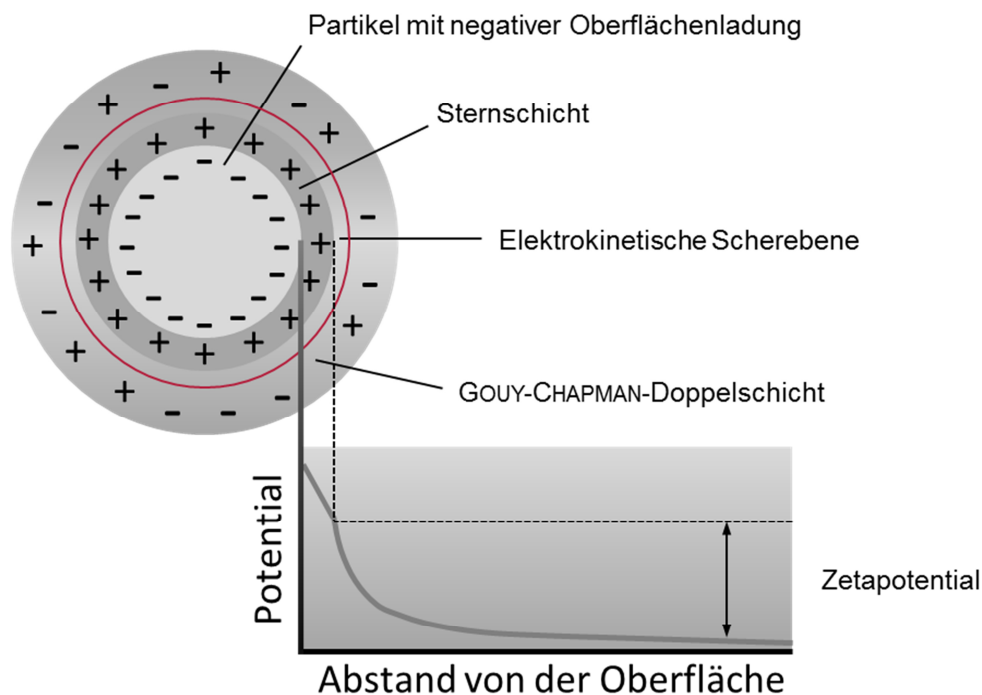


Abbildung 5—5 Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht an der Oberfläche von Nanopartikeln.

Zetapotentialmessungen erlauben nicht nur die Bestimmung der Oberflächenladungen von kolloidalen Systemen, es lassen sich auch Aussagen über die Stabilität von Dispersionen treffen. Bei einem Zetapotential größer als ± 30 mV wird von einer elektrostatisch ausreichend stabilisierten Dispersion gesprochen. Der Grund dafür sind die vorhandenen repulsiven Wechselwirkungen zwischen gleich geladenen Teilchen, die bei zunehmender Annäherung kontinuierlich zunehmen. Dadurch wird eine weitere Annäherung und damit eine Flokkulation bzw. Koagulation der Partikel vermieden.

5.1.4 Messprinzip des Zetapotentials^{179,180}

Zur Bestimmung des Zetapotentials werden hauptsächlich elektrophoretische Methoden verwendet. Dabei wird sich die Wanderung der Partikel durch Anlegen einer äußeren

Spannung zu Nutze gemacht. In der Literatur werden hierbei mikroskopische Beobachtungen der Partikelbewegungen im Dunkelfeld oder Geschwindigkeitsanalysen auf Basis des LASER-DOPPLER-Effekts angeführt, auf dem auch die Zetapotentialbestimmungen im Zetasizer Nano ZS beruhen. Gemäß Abbildung 5—6 erfährt gestreutes Licht eine Frequenzverschiebung, wenn sich die Streuzentren bewegen.

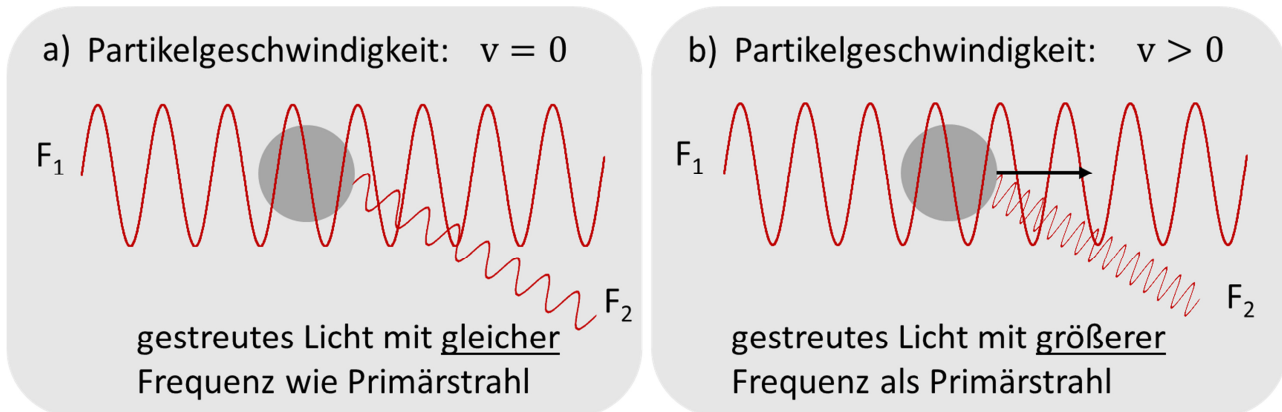


Abbildung 5—6 Frequenzverschiebung des Laserlichts an a) einem starren Partikel und b) an einem bewegten Partikel.

Durch die hohe Frequenz des eingestrahlten Lichtes von etwa 10^{14} Hz ist die erhaltene Frequenzverschiebung jedoch so gering, dass eine Messung entweder über interferometrische Methoden oder über ein Mischen von einem Paar kohärenter Laserstrahlen durchgeführt werden muss. Im Zetasizer Nano ZS wird zuletzt genanntes Verfahren als „optical mixing“ bezeichnet und sieht die Kreuzung der Laserstrahlen in der Probenlösung vor. Einer der Strahlen passiert die Probe und wird Streustrahl genannt, während der andere Strahl an der Küvette vorbei geleitet wird. Dadurch wird im Kreuzungsbereich ein Interferenzmuster generiert. Sind nun Partikel im Kreuzungsbereich vorhanden, so werden diese in Vorwärtsrichtung vom Sensor detektiert. Bei bewegten Partikeln tritt die beschriebene Frequenzverschiebung im gekreuzten Licht auf, sodass letztlich aus dem Frequenzspektrum die elektrophoretische Mobilität u mithilfe von Gleichung 3 bestimmt werden kann.

$$\Delta\nu = \left(\frac{2n}{\lambda_0}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) uE \quad \text{Gleichung 3}$$

Hier steht $\Delta\nu$ für den DOPPLER-Shift, n für den Brechungsindex des Mediums, λ_0 für die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, θ für den Streuwinkel und E für das elektrische Feld.

In der Folge kann dann das Zetapotential ζ mithilfe der nachstehenden HENRY-Gleichung (Gleichung 4) berechnet werden,

$$u = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

Gleichung 4

in der ε die Dielektrizitätskonstante der Probe, η die Viskosität des Lösungsmittels und $f(\kappa a)$ die HENRY-Funktion ist. In der HENRY-Funktion beschreibt κ die Debye-Länge, κ^{-1} wird häufig als „Dicke“ der elektrischen Doppelschicht bezeichnet. Der Parameter a bezieht sich auf den Radius der Partikel und gibt daher zusammen mit κ das Verhältnis von Partikelradius zur Dicke der Doppelschicht an. Abhängig vom Lösungsmittel wird nun die HENRY-Funktion entweder aus der HÜCKEL- oder der SMOLUCHOWSKI-Näherung erhalten. Wässrige Dispersionen gehorchen der SMOLUCHOWSKI-Näherung und führen zu $f(\kappa a) = 1,5$, während nichtwässrige Systeme mit $f(\kappa a) = 1,0$ der HÜCKEL-Näherung entsprechen. In der Abbildung 5—7 sind beide Näherungen schematisch dargestellt.

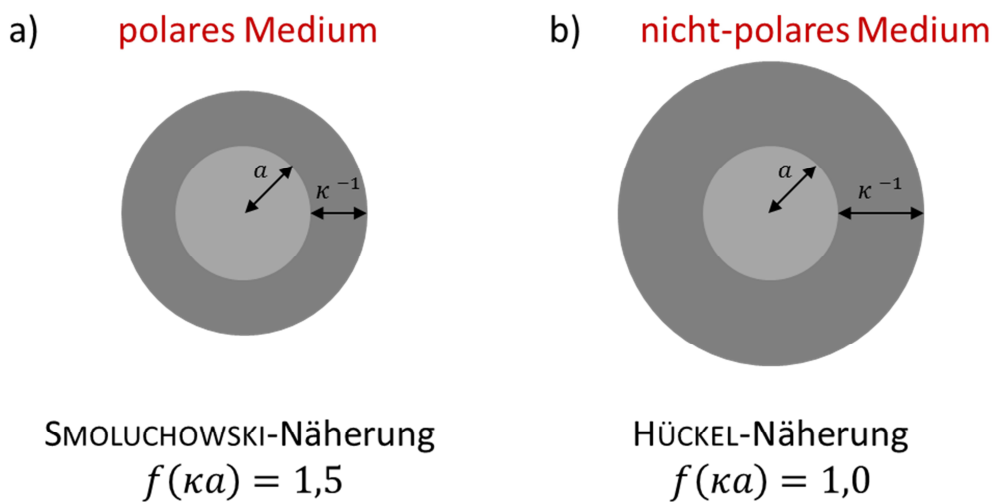


Abbildung 5—7 Henry-Funktion $f(\kappa a)$ der a) SMOLUCHOWSKI- und b) HÜCKEL-Näherung.

Theoretisch müssten zusätzlich zu den Kräften des elektrischen Feldes und der STOKES'schen Reibung auch noch die elektrophoretische Retardation und der Relaxationseffekt berücksichtigt werden. Dies würde jedoch zu komplexen Berechnungen führen und soll hier nicht weiter erörtert werden.

5.2 Ellipsometrie¹⁸¹

Die Ellipsometrie dient als Analysemethode für die Charakterisierung von Oberflächen und dünnen Filmen und geht auf die Arbeiten von DRUDE vor über 100 Jahren zurück.¹⁸² Prinzipiell beruht das Verfahren auf der Tatsache, dass die Reflektion elektromagnetischer Wellen an einer Oberfläche die Änderung des Polarisationszustandes und der Amplitude nach sich zieht. Dadurch können in der Folge Rückschlüsse über die Probeneigenschaften, wie Brechungsindex und Extinktionskoeffizient, durch die Messung des reflektierten Lichtstrahls

gezogen werden. Ferner kann über die Änderung des Polarisationszustands eine Schichtdickenbestimmung im Nanometerbereich durchgeführt werden.

Bei der Ellipsometrie wird Licht mit bekanntem Polarisationszustand, zumeist linear polarisiertes Licht eines Lasers, auf die zu untersuchende Probe gestrahlt (Abbildung 5—8). Dabei passiert das Licht zunächst eine $\lambda/4$ -Platte, die als anisotropes, optisches Bauteil die elliptische Polarisation des Laserstrahls ermöglicht. Trifft das elliptisch polarisierte Licht nun auf die Probenoberfläche, erfährt es eine erneute Polarisationsänderung. Dabei wird die Elliptizität des einfallenden Strahles durch den Polarisator so eingestellt, dass das reflektierte Licht linear polarisiert ist. Ein zweiter Polarisationsfilter, der Analysator, dient nun dazu das linear polarisierte Licht auszulöschen. Folglich führt diese Auslöschung zu einer Intensität von Null am Detektor, weshalb die in dieser Arbeit verwendete Methode auch Nullellipsometrie genannt wird. Bei einer Messung werden dazu so lange Polarisator und Analysator gegeneinander rotiert, bis im Detektor ein Minimum erhalten wird.

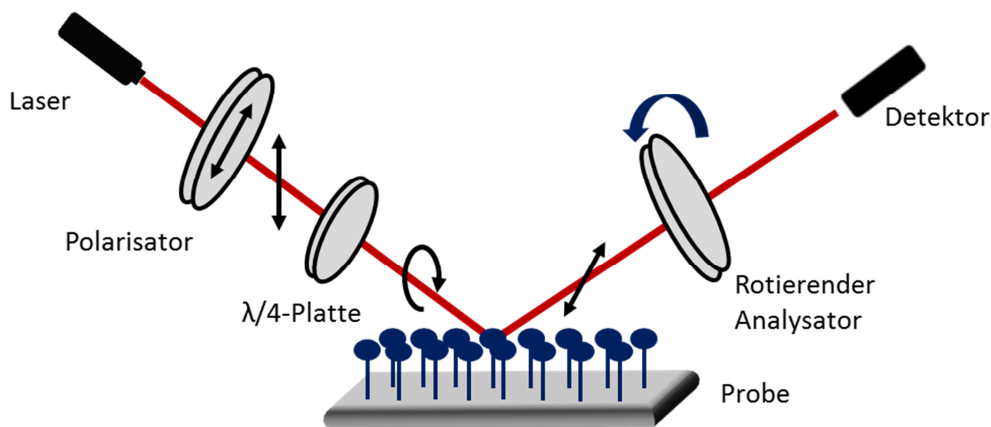


Abbildung 5—8 Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.

Infolge der Reflektion am Substrat können sich die Amplituden der parallelen und senkrechten (p- und s-Komponente) Komponente des Lichtes ändern. Mathematisch gesehen kann der Quotient der Beträge der totalen Reflexionskoeffizienten $|R^p|$ und $|R^s|$ als $\tan \psi$ bezeichnet werden (Gleichung 5). Der Winkel ψ kann Werte zwischen 0 und 90° annehmen.

$$\tan \psi = \frac{|R^p|}{|R^s|} \quad \text{Gleichung 5}$$

Des Weiteren kann die Variable Δ eingeführt werden, die sich als die Phasendifferenz zwischen der p- und der s-Komponente der eintreffenden Lichtwelle δ_1 , und der ausstrahlenden Welle δ_2 definieren lässt (Gleichung 6).

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2$$

Gleichung 6

Die Variablen ψ und Δ werden als ellipsometrische Winkel bezeichnet und werden direkt bei der Messung erhalten. Daraus ergibt sich die nachstehende fundamentale Gleichung 7 der Ellipsometrie.

$$\tan \psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{|R^p|}{|R^s|} \cdot e^{i(\delta_1 - \delta_2)} = \frac{R^p}{R^s}$$

Gleichung 7

Aus ψ und Δ können der Brechungsindex und der Extinktionskoeffizient des analysierten Substrates bestimmt werden. Ausgehend davon kann über ein entsprechendes Modellsystem die Berechnung der Schichtdicken und der komplexen Brechungsindices von dünnen Schichten erfolgen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass das Ellipsometer lediglich eine genaue Bestimmung der Variablen ψ und Δ liefert. Die Schichtdicke hingegen wird auf Basis eines selbst erstellten Schichtmodells berechnet. Daher ist es essentiell, das Schichtmodell mit höchster Sorgfalt zu erstellen und eine ungefähre Kenntnis über den zu erwartenden Brechungsindex zu besitzen, um die Schichtdicken verlässlich berechnen zu können.

5.3 Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS)^{183,184}

Eine weitverbreitete Methode zur Charakterisierung von Substratoberflächen durch Infrarot-Spektroskopie wurde zuerst von GREENLER im Jahr 1966 beschrieben.¹⁸⁵ Sie wird im Folgenden als Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS) bezeichnet, wenngleich die Benennungen Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) oder „grazing incidence reflection“ (GIR; engl. streifender Einfall) auch gebräuchlich sind. Die Bezeichnung GIR findet in der Literatur im Allgemeinen eher weniger Verwendung, obwohl der streifende Einfall des Infrarotstrahls die Bedingungen des Reflektionsexperiments besser wiedergibt als die anderen Akronyme es tun. In Abbildung 5—9 ist das Prinzip einer RAIRS-Messung schematisch dargestellt. Dabei erfolgt die Messung durch einen Infrarotstrahl im streifenden Einfall, d.h. bei einem sehr spitzen Winkel (etwa 80°), an der Probenoberfläche. Dadurch wird die Weglänge des Infrarotstrahls in der zu untersuchenden Probe vergrößert. Zusätzlich wird das Infrarotlicht durch Reflektion insgesamt zweimal über die Oberfläche geleitet, wodurch mit dieser Messanordnung Monoschichten von wenigen Nanometern auf gut reflektierenden Oberflächen wie Gold oder Titan untersucht werden können. Zudem kann mithilfe eines Polarisators polarisierte Strahlung erzeugt werden, wodurch aufgrund

der eingeschränkten Beweglichkeit der angebundenen Moleküle deren Anordnung bestimmt werden kann.

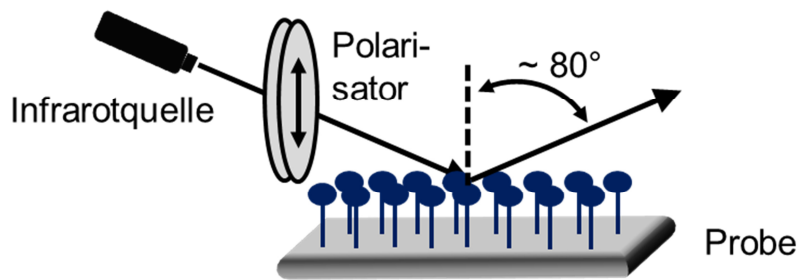


Abbildung 5—9 Schematischer Aufbau eines RAIRS-Experiments.

In einem typischen RAIRS-Experiment wird das Infrarotlicht aus der Strahlungsquelle durch eine Reihe von Gold-beschichteten Spiegeln auf die Probenoberfläche gelenkt. Die aufprallenden Photonen interagieren in der Folge mit den immobilisierten Molekülen und werden über eine weitere Reihe von Spiegeln in Richtung des Detektors reflektiert. Das Rohsignal wird letztlich in die bekannte Frequenzdomäne Fourier-transformiert. Die RAIRS-Methode gilt damit als Mischung aus Transmissions- und Reflektions-Infrarot-Spektroskopie. Daher können die erhaltenen Spektren direkt mit herkömmlichen Transmissionsspektren verglichen werden.

5.4 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)¹⁸⁶

Die 1981 von SIEGBAHN entwickelte Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) wird zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung von Oberflächen verwendet. Daraus können, mit Ausnahme von Wasserstoff und Helium, Aussagen über den Gehalt des jeweiligen Elements ab einem atomaren Anteil über 0,1 % getroffen werden. Mit einer Informationstiefe von bis zu 10 nm ist diese Methode sehr oberflächensensitiv. Ferner liefert XPS Informationen zu den Bindungsverhältnissen und der elektronischen Struktur von Grenzbeziehungsweise Oberflächen.

Grundsätzlich beruhen XPS-Messungen auf dem von EINSTEIN beschriebenen photoelektrischen Effekt.¹⁸⁷ Durch die Bestrahlung von Materie mit Röntgenquanten einer bestimmten Energie, werden Elektronen freigesetzt. Die grundlegenden physikalischen Gesetzmäßigkeiten können durch die nachstehende EINSTEIN-Gleichung 8 beschrieben werden, wobei E_B die für jedes Element spezifische Bindungsenergie, $h\nu$ die Energie der Röntgenfluoreszenz und E_{kin} die kinetische Energie der Photoelektronen darstellt.

$$E_B = h\nu - E_{kin}$$

Gleichung 8

Folglich kann E_B relativ einfach bestimmt werden, da $h\nu$ bekannt ist und E_{kin} im Experiment gemessen wird. Neben der „einfachen“ Photoemission sind bei der Bestrahlung von Festkörpern gemäß Abbildung 5–10 noch weitere Effekte zu berücksichtigen. So kann es vorkommen, dass ein „Elektronenloch“ mit einem weiteren Elektron aus einer höheren Elektronenschale aufgefüllt wird und es zu einer Neuordnung der resultierenden Elektronenkonfiguration kommt. Dadurch wird Energie freigesetzt, welche entweder zu einer Röntgenfluoreszenz oder zur Emission eines Sekundärelektrons durch einen AUGER-Übergang führt. Bei der XPS-Methode wird dabei die Röntgenfluoreszenz aufgrund ihrer geringen Emissionsbreite und der definierten Energie ausgenutzt.

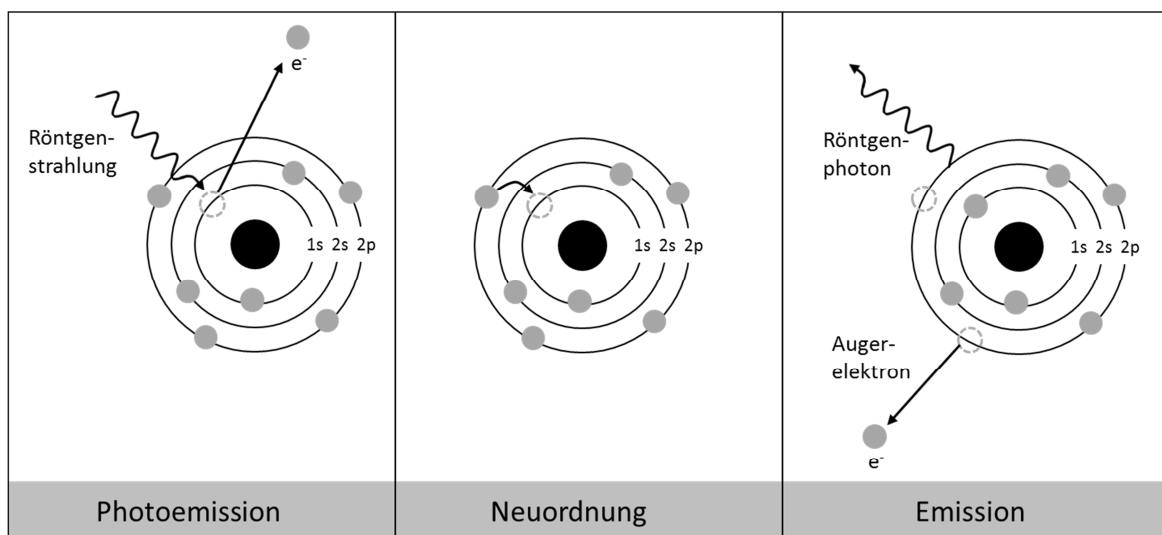


Abbildung 5–10 Schematische Darstellung der Photoemission mit folgender Neuordnung der Elektronen und der freigesetzten Röntgenfluoreszenz nach Bestrahlung eines Atoms mit hochenergetischen Photonen.

In einem typischen XPS-Experiment wird die Probe mit Röntgenwellen definierter Energie und geringer Linienbreite bestrahlt. Je nach Anodenmaterial wird beispielsweise für Magnesium die $K\alpha$ -Linie bei 1253,6 eV mit einer Halbwertsbreite von 0,7 eV respektive für Aluminium die $K\alpha$ -Linie bei 1486,6 eV mit einer Halbwertsbreite von 0,85 eV gewählt. Während der Messung wird am hemisphärischen Energieanalysator eine elektrische Spannung V_{HK} angelegt, wodurch im Laufe des Experiments Elektronen entsprechend ihrer kinetischen Energien auf verschieden stark gekrümmte Bahnen gelenkt werden. Nur Elektronen definierter kinetischer Energie können den Ausgangsschlitz auf einer Bahn mit dem Radius r_0 verlassen und am Detektor gemessen werden. Durch kontinuierliches Ändern der Spannung V_{HK} können Elektronen somit bezüglich ihrer Energie und ihrer Anzahl selektiert werden.

Zunächst wird anhand eines Übersichtsspektrums in einem Bereich von etwa 1000 eV die Elementzusammensetzung der Oberfläche identifiziert. In Abbildung 5—11 ist ein Übersichtsspektrum eines unbeschichteten, gesäuberten Substrats von legiertem Titan (TiAl6V4) dargestellt, welches Informationen über die gemessene Bindungsenergie und das relative Verhältnis der detektierten Elemente liefert.

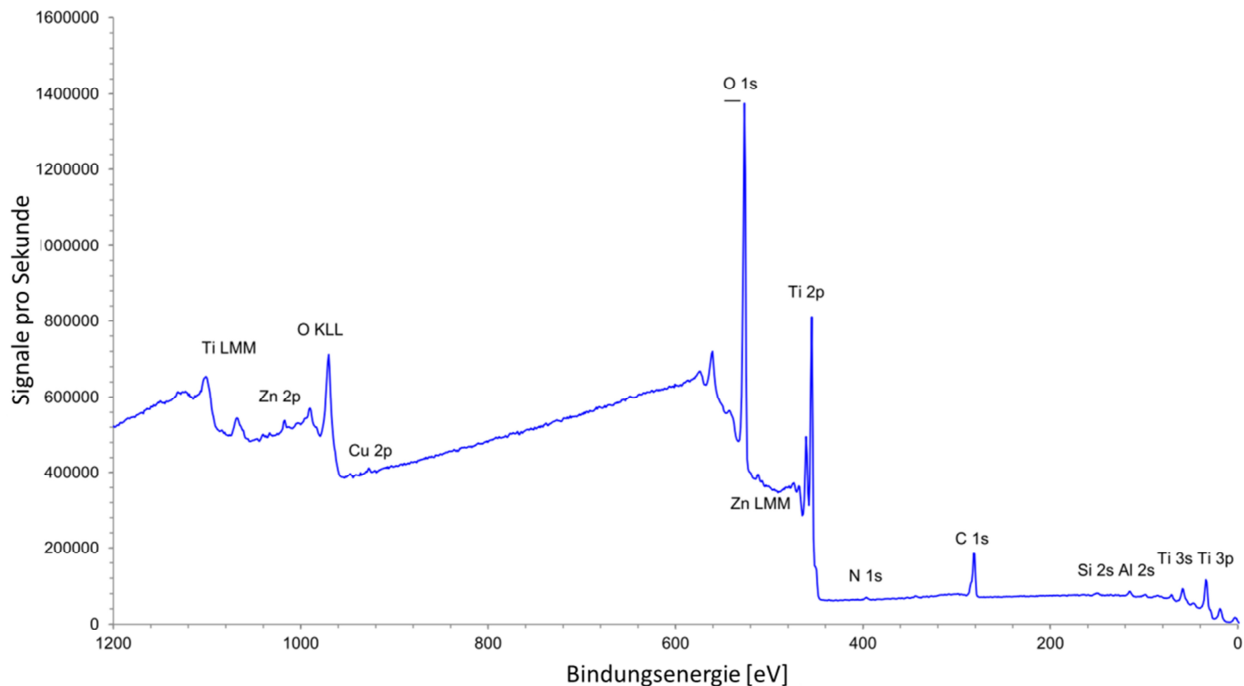


Abbildung 5—11 Übersichtsspektrum eines unbeschichteten TiAl6V4-Substrats.

Ausgehend von den Übersichtsspektren erlauben hochauflösende Detailspektren im Bereich von 20 eV die unabhängige Analyse einzelner Elemente, wie in Abbildung 5—12 für Kohlenstoff (C1s) gezeigt. Da die Bindungsenergien durch die chemische Umgebung der Elektronen beeinflusst werden, können mithilfe der Detailspektren wichtige Informationen über molekulare Bindungszustände erhalten werden.

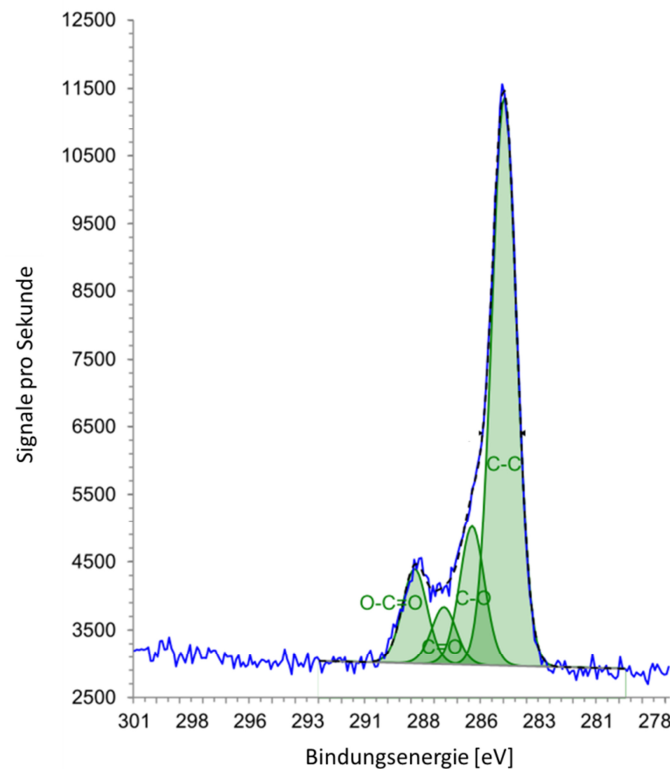


Abbildung 5—12 Detailspektrum (C1s) eines unbeschichteten TiAl6V4-Substrats.

5.5 Quarzkristallmikrowaage (QCM-D)¹⁸⁸

Mit der Quarzmikrowaage (QCM) können Massenänderungen, hervorgerufen durch die Ad- bzw. Desorption von Stoffen auf einem Substrat, mit mechanisch-akustischen Sensoren detektiert werden. Die Messungen beruhen auf dem piezoelektrischen Effekt, der 1880 von CURIE entdeckt wurde.¹⁸⁹ Der Sensor selbst besteht aus einer dünnen Quarzscheibe, welche mit einem AT-Schnitt^{xvii} hergestellt wurde. Beim Anlegen einer Wechselspannung schwingt der Quarzkristall mit einer definierten Frequenz, die von den Ausmaßen des Kristalls abhängt. SAUERBREY konnte in den 1950er Jahren beweisen, dass es eine proportionale Beziehung zwischen der Frequenzverschiebung und der Masse gibt, welche auf einem oszillierenden Kristall abgeschieden oder entfernt wird.¹⁹⁰ In der nachstehenden SAUERBREY-Gleichung Gleichung 9

$$\Delta m = -C_f \cdot \Delta f \quad \text{Gleichung 9}$$

werden Δm als Massenänderung und Δf als Frequenzänderung definiert, während C_f eine kristallabhängige Konstante ist. Die SAUERBREY-Gleichung Gleichung 9 gilt streng genommen nur für starre, gleichmäßige Schichten, die direkt an die Messoberfläche adsorbiert sind.

^{xvii} Die am häufigsten verwendeten Quarzkristalle sind mit einem AT-Schnitt hergestellt wurden, in dem der Kristall bei einem Winkel von 35° zur optischen Achse geschnitten wird.

Abgeschiedene Polymer- oder Biomolekülschichten sind jedoch oftmals weich und können unter Umständen große Mengen an Wasser enthalten (vergleiche Abbildung 5—13). Daher erlaubt die SAUERBREY-Gleichung häufig keine korrekte Bestimmung der Masse und der Struktur der adsorbierten Schicht.

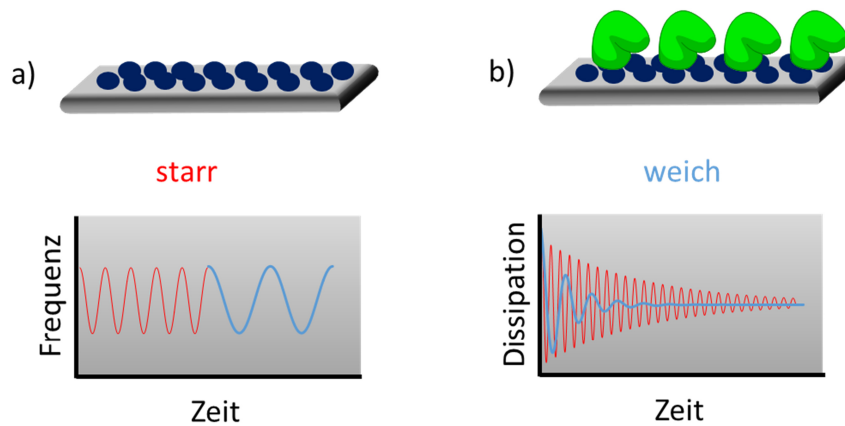


Abbildung 5—13 Vergleich der Frequenz- und Dissipationsänderungen bei a) starren und b) weichen Filmen auf der Substratoberfläche.

Um diese Problematik zu überwinden, wurde die QCM-D (Quarzkrystallmikrowaage mit Dissipationsmonitoring) entwickelt, bei der neben der Frequenz auch die Dissipation^{xviii} der Schwingung gemessen wird. Diese Dissipation wird durch die viskoelastischen Eigenschaften der adsorbierten Schicht verursacht und kann vornehmlich in Fluiden beobachtet werden. Eine Näherung dieses Verhaltens kann mithilfe des VOIGT-Modells beschrieben werden.¹⁹¹ Durch die zusätzliche Messung der Dissipation kann festgestellt werden, ob sich eine adsorbierte Schicht starr verhält. Des Weiteren können durch die Anwendung von viskoelastischen Modellen Schichteigenschaften wie Schichtdicke, Viskosität oder elastisches Modul quantifiziert werden.¹⁹² Für weiterführende Literatur zum Thema „Quarzkrystallmikrowaage mit Dissipation“ wird auf die Veröffentlichungen von JOHANNSMANN und DIXON verwiesen.^{188,193}

^{xviii} Die Dissipation wird als Dämpfung der Schwingung bezeichnet und gibt Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften des Adsorptionsprozesses.¹⁸⁸

6. Ergebnisse

6.1 Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel

Die Verwendung von Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikeln als Drug-Delivery-System (DDS) wurde bereits ausführlich in der Literaturübersicht im Kapitel 4.1 (Seite 28) diskutiert. Das System wurde von POTH im Arbeitskreis etabliert und zur Präsentation des „bone morphogenetic proteins 2“ (BMP-2) verwendet.⁹³ Aufgrund dieser Vorarbeiten wurden die CS/TPP-Nanopartikel zunächst als Freisetzungssystem für Interferon- β untersucht. Im Hinblick auf die Entwicklung von bioresponsiven DDS wurde, ähnlich wie bei POTH, für die Degradation das Enzym Lysozym verwendet, welches im menschlichen Organismus allgegenwärtig ist.^{130,131} Damit Chitosan im medizinischen Bereich überhaupt verwendet werden kann, muss jedoch eine hohe Reinheit des Polysaccharids gewährleistet werden. Die Anwesenheit von Kontaminanten wie Proteinen, Metallionen oder weiteren Fremdstoffen könnte die Gelierung und die Verabreichung beeinflussen und zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.¹²⁴ Eine Aufreinigung des Chitosans ist im Hinblick auf eine potentielle Verwendung für *in vivo* und *in vitro* Studien daher zwingend erforderlich. Es wurde die Methode nach GAN et al. ausgewählt,¹¹⁸ mit der das verunreinigte Ausgangsmaterial in ein weißes, geruchloses watteähnliches Produkt überführt werden konnte. Das Produkt wurde mittels ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert und hatte einen mittleren Deacetylierungsgrad von 83 %. Das aufgereinigte Chitosan (CS-83) wurde für die nachstehend beschriebenen Partikelbildungen verwendet und fungierte als Ausgangsstoff für die Synthesen der niedriger deacetylierten Chitosanderivate mit Deacetylierungsgraden von 58 % (CS-58) und 72 % (CS-72).^{xix} Durch die Herstellung eines größeren „CS-83-Batches“ konnte damit gewährleistet werden, dass stets dasselbe Ausgangsmaterial für die Umsetzungen verwendet wurde.

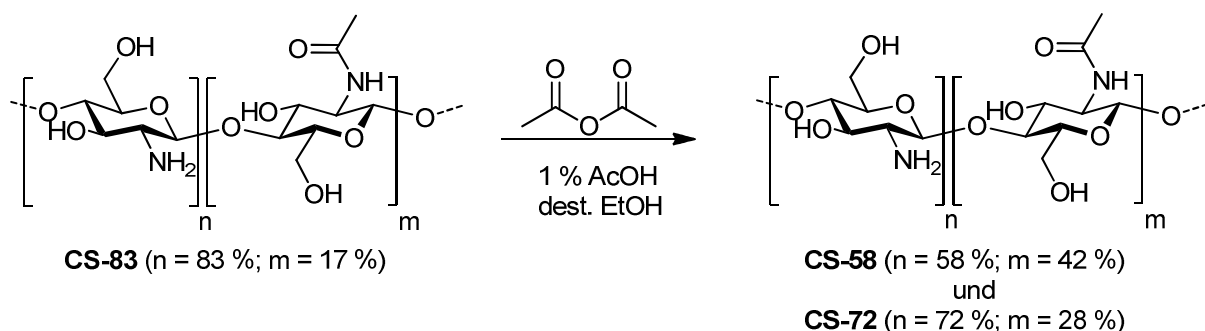
6.1.1 Partikelcharakterisierung

Die Partikelbildung aus dem Polykation Chitosan (CS) und dem Polyanion Natriumtripolyphosphat (TPP) basiert, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, auf ionischen Wechselwirkungen. Dieser als ionotrope Gelierung bezeichnete Prozess wird durch die Zugabe einer TPP-Lösung zu einer CS-Lösung eingeleitet. Nach der Durchmischung der

^{xix} Die ^1H -NMR-Spektren von CS-83, CS-72 und CS-58, die für die Bestimmung des Deacetylierungsgrades verwendet wurden, befinden sich in Anhang 10-17 bis Anhang 10-19.

Suspension mit einer Eppendorfpipette kann die Partikelbildung als abgeschlossen betrachtet werden.

Partikeleigenschaften wie beispielsweise die Größe, die Verteilungsbreite und das Zetapotential lassen sich durch die Variation des Mischungsverhältnisses und des pH-Wertes beeinflussen. POTH konnte durch die Untersuchung verschiedener Mischungsverhältnisse bereits zeigen, dass 1 mg/mL konzentrierte Lösungen beider Nanopartikelkomponenten in den Verhältnissen von 2:1 und 3:1 (CS-83:TPP) zu einer geringen Verteilungsbreite (PDI) im Bereich von 0,2 bis 0,3 führen. Der PDI gilt als Maß für die Homogenität der Probe und beschreibt bei niedrigen Werten monodisperse Systeme. Die Variation des pH-Werts durch die Verwendung von 0,75 %-iger und 0,075 %-iger Essigsäure (AcOH) zeigte keine signifikante Änderung der Partikelgröße, während das Zetapotential die zu erwartende pH-Wertabhängigkeit aufwies.¹¹⁵ Dabei führte eine Erhöhung der Essigsäurekonzentration zu einem gesteigerten Zetapotential der Partikel, da infolge der Protonierung der Aminogruppen des Chitosans eine höhere positive Ladungsdichte resultiert. Von FREIER et al. wurde festgestellt, dass die Degradationsrate mit dem verwendeten Deacetylierungsgrad des Chitosans korreliert ist. Chitosanen mit hohen Deacetylierungsgraden von 83 % werden dabei sehr niedrige Abbaugeschwindigkeiten zugesprochen, wohingegen Derivate mit niedrigeren Deacetylierungsgraden schnellere Degradation zeigen.¹³¹ Um eine proteolytisch bedingte Freisetzung des Wirkstoffs aus den Nanopartikeln zu erreichen, wurde das System daher biodegradabel gestaltet. Laut FREIER et al. ist eine Acetylierung des verwendeten Chitosans (CS-83) auf bis zu 60 % Deacetylierungsgrad notwendig, um eine gute enzymatische Degradabilität zu gewährleisten.¹³¹ Die Synthese der beiden Chitosanderivate CS-58 und CS-72, ausgehend von CS-83, ist im nachstehenden Reaktionsschema 6-1 unter Verwendung von Essigsäureanhydrid illustriert.



Reaktionsschema 6-1

Acetylierung von CS-83 mit Essigsäureanhydrid zu den niedriger deacetylierten Derivaten CS-58 und CS-72.

Anschließend wurden von den drei Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 1 mg/ml konzentrierte Lösungen in 0,1 % Essigsäure (AcOH) hergestellt und mit TPP (1 mg/mL in 0,1 % AcOH) in Nanopartikelsuspensionen überführt. Das Mischungsverhältnis wurde mit 3:1 (CS:TPP) gewählt, um Nanopartikel mit einer möglichst geringen Verteilungsbreite (PDI) zu erhalten. Die erhaltenen Partikelgrößenverteilungen sind in Abbildung 6—1 dargestellt. Für alle drei Formulierungen konnten mit CS-83 (151 ± 47 nm), CS-72 (176 ± 41 nm) und CS-58 (153 ± 35 nm) ähnliche Partikelgrößen erhalten werden. Die Proben können angesichts des Polydispersitätsindex zwischen 0,23 – 0,26 als monodispers bezeichnet werden. Mit den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Nanopartikel unabhängig vom Deacetylierungsgrad des Chitosans bei den betrachteten Konzentrationen und dem Mischungsverhältnis reproduzierbar herstellen lassen.

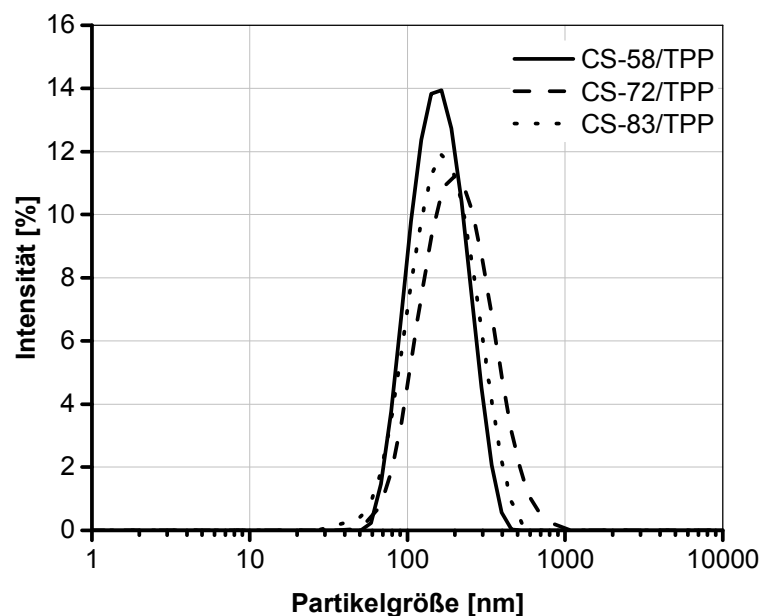


Abbildung 6—1 Partikelgrößenmessung der CS/TPP-Formulierungen mit den drei Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1).

Zusätzlich zur Dynamischen Lichtstreuung wurden zwei Partikelformulierungen per Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM) vermessen.^{xx} Diese Methode erlaubt im Gegensatz zur Standard-REM auch die Analyse feuchter Proben. Dabei wird die zu untersuchende Probe mit einer hohen Abkühlrate eingefroren, um eine Sublimation des Wassers stark zu verlangsamen. Des Weiteren kann durch das schnelle Abkühlen, z.B. mit flüssigen Stickstoff oder Ethan, die Eiskristallbildung vermieden werden. Nach dem Einfrieren werden die Proben in dünne Scheiben geschnitten, die im Anschluss analysiert

^{xx} Sämtliche Kryo-REM-Messungen wurden von Frau Dr. Brigitte Tiersch am Institut für Kolloidchemie der Universität Potsdam durchgeführt.

werden.¹⁹⁴ In Abbildung 6—2 sind die Resultate der Kryo-REM-Messungen der CS-83/TPP- und der CS-58/TPP-Formulierungen dargestellt. Die Nanopartikel in den Aufnahmen können als überwiegend sphärische Strukturen beschrieben werden, die eine Größe von etwa 60 – 120 nm aufweisen. Dieser Befund lässt sich mit den TEM-Aufnahmen von Xu et al. für CS-92/TPP korrelieren, in denen sphärische Partikel mit Größen von 20 bis 200 nm beobachtet werden konnten.¹⁹⁵ Zudem scheinen die gemessenen Partikelgrößen unabhängig vom Deacetylierungsgrad des Chitosans zu sein, da kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Proben festgestellt werden kann. Im Vergleich mit den zuvor vorgestellten Ergebnissen der DLS können mithilfe der Kryo-REM-Untersuchungen etwas kleinere Partikeldurchmesser erhalten werden. Dieser Befund resultiert vermutlich aus der sphärischen Geometrie der betrachteten Partikel, die bei den DLS-Messungen und der anschließenden Berechnung berücksichtigt werden. Aus Abbildung 6—2 können jedoch neben kugelförmigen auch deformierte, ovale beziehungsweise längliche Partikel beobachtet werden. Aus diesem Grund geben die Kryo-REM-Untersuchungen die tatsächliche Morphologie der Proben besser wieder und stellen in Kombination mit der DLS eine aussagekräftige Methode zur Bestimmung von Partikeldurchmessern dar.

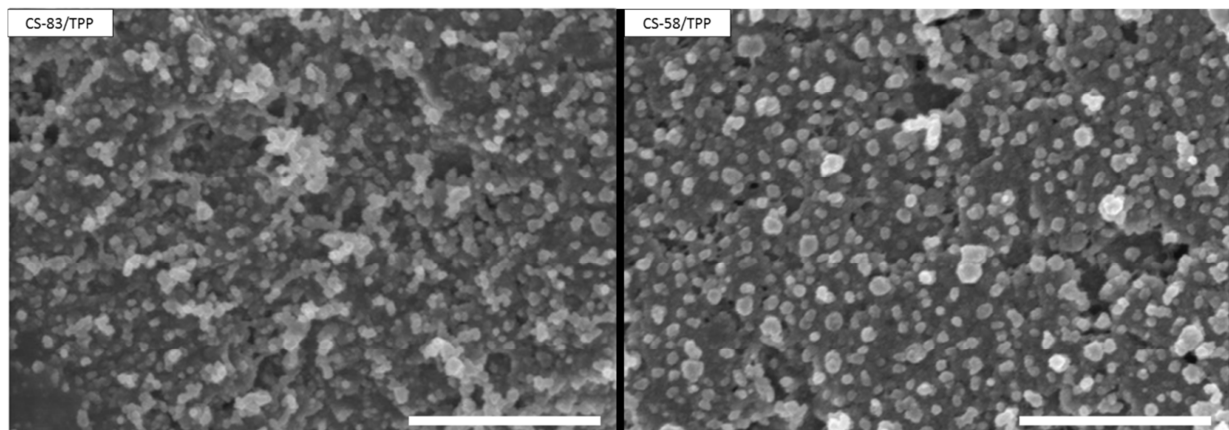


Abbildung 6—2 Kryo-REM-Aufnahmen der CS-83/TPP- und der CS-58/TPP-Formulierungen (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

Neben der Partikelgröße wurde das Zetapotential der Probe betrachtet. In Abbildung 6—3 sind die Zetapotentiale der drei Formulierungen aus den Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 in Kombination mit Tripolyphosphat gezeigt. Dabei kann eine Zunahme des Zetapotentials von +22 mV (CS-58) über +26 mV (CS-72) auf bis zu +44 mV (CS-83) festgestellt werden. Diese Beobachtung geht mit dem Ladungsverhältnis des Chitosans in essigsaurer Umgebung einher. Das hoch deacetylierte Chitosan CS-83 besitzt deutlich mehr protonierbare Aminogruppen als die weniger deacetylierten Derivate CS-58 und CS-72.

Daraus resultiert letztlich eine größere Oberflächenladung, die bei der Zetapotentialmessung in Abbildung 6—3 beobachtet werden konnte.

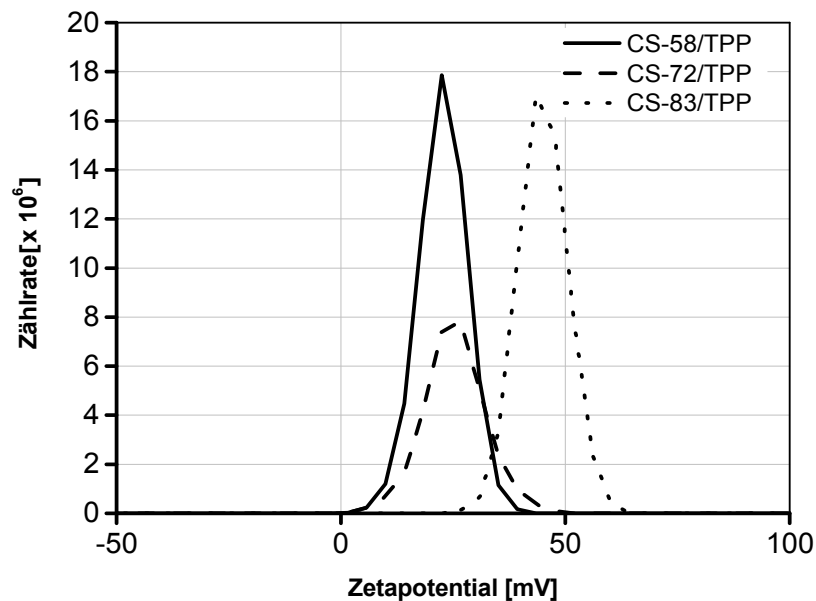


Abbildung 6—3 Zetapotentialmessung der CS/TPP-Formulierungen mit den drei Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1).

Laut PUJALA et al. kann von stabilen Nanopartikelsuspensionen erst ab einem Zetapotential von über +30 mV ausgegangen werden. Durch Stabilitätsstudien bei 37 °C konnte jedoch (siehe Anhang 10-1) eine spontane Koagulation bei allen drei CS/TPP-Formulierungen ausgeschlossen werden.

Es wurden Degradationsstudien durchgeführt, bei denen die Partikelsuspensionen in Gegenwart von Lysozym bei 37 °C inkubiert wurden. Für die Ansätze wurde jeweils 1,5 µg/mL Lysozym verwendet, da dies laut BROUWER et al. der Konzentration von Lysozym in humanem Serum entspricht.¹⁹⁶ Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde das Experiment mehrmals wiederholt und lieferte jeweils vergleichbare Resultate. Abbildung 6—4 verdeutlicht die Degradation der Partikel in Abhängigkeit vom Deacetylierungsgrad der Partikel exemplarisch anhand einer Partikelgrößenmessung über mehrere Tage. Die CS-58/TPP-Formulierung zeigt hierbei eine drastische Partikelgrößenabnahme von etwa 200 nm auf 170 nm innerhalb zwölf Stunden. Anschließend wird ein Plateau erreicht, in dem keine weitere Partikelgrößenabnahme mehr stattfindet. Bei der Betrachtung der CS-72/TPP- und CS-83/TPP-Nanopartikel hingegen fällt auf, dass die Partikelgrößenabnahme deutlich verlangsamt bzw. gar nicht abläuft. Die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Degradationsstabilität vom Deacetylierungsgrad des Chitosans konnte somit bestätigt werden. Sie kann laut FREIER et al. auf die unterschiedliche Polymerstruktur zurückgeführt

werden.¹³¹ Das Enzym Lysozym besitzt eine hexamere Bindungsstelle¹⁹⁷ und spaltet ausschließlich Substrate mit aufeinanderfolgenden N-Acetylglukosamineinheiten.¹³¹ Das aufgereinigte Produkt CS-83 weist mit seinem hohen Deacetylierungsgrad jedoch größtenteils nicht-acetylierte Glukosamineinheiten auf. Daraus resultiert das schlechte Degradationsverhalten in Gegenwart von Lysozym. Mit CS-58 und CS-72 konnten Chitosanderivate hergestellt werden, welche durch physiologische Konzentrationen von Lysozym abgebaut werden können, da der prozentuale Anteil von sukzessiven N-Acetylglukosamineinheiten in den Polymeren gesteigert ist.

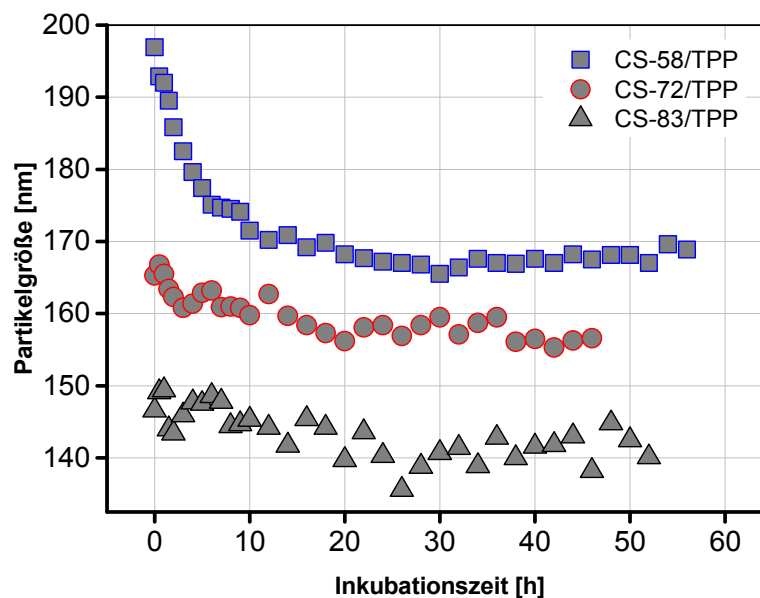


Abbildung 6—4 Degradationsverhalten der CS/TPP-Formulierungen mit den drei Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1) in Gegenwart von 1,5 µg/mL Lysozym.

6.1.2 Beschichtungen

Die Verwendung der Nanopartikel als Beschichtungsmaterial für Titanoberflächen wurde bereits von POTH erfolgreich untersucht. Vor allem im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als Implantatbeschichtung ist eine ausreichende Stabilität erforderlich. POTH konnte eine gute Beständigkeit der Beschichtungen mit CS-83/TPP-Nanopartikeln in Wasser und Phosphatpuffer (PBS) dokumentieren, während die Schichtdicken der Beschichtungen mit den CS-58/TPP-Partikeln während der Inkubation mit H₂O und PBS abnahmen.^{93,115} Um diesen Befund weiter zu verifizieren, wurden Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel mit CS-58, CS-72 und CS-83 hergestellt. Nach der standardmäßigen Charakterisierung der Nanopartikelsuspensionen per Dynamischer Lichtstreuung wurden die Partikelsuspensionen auf Titanoberflächen aufgesprüht und getrocknet. Nach einem Waschschrift wurden die Substrate ellipsometrisch vermessen, um Rückschlüsse über die Schichtdicke zu erhalten.

Mit einer dreiminütigen Sprühbeschichtung (etwa 0,02 mg, 20 μ L) wurden Schichtdicken, unabhängig vom Deacetylierungsgrad des Chitosans, von 73 – 78 nm mit einem maximalen Fehler von 10 nm erzeugt (siehe Abbildung 6—5). Die Präparation der Substrate kann trotz manueller Sprühtechnik gut reproduzierbar durchgeführt werden.

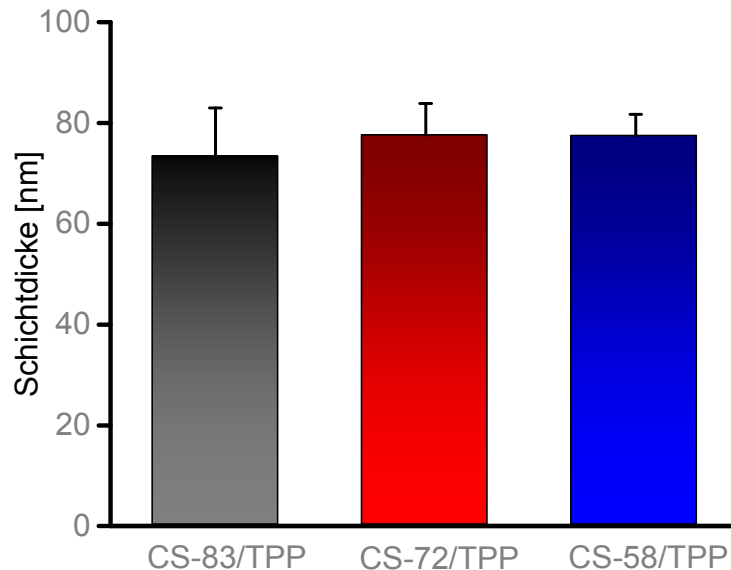


Abbildung 6—5 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der drei CS/TPP-Beschichtungen CS-83/TPP, CS-72/TPP und CS-58/TPP auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 5.

Zusätzlich zu den Ellipsometermessungen wurde eine CS-83/TPP-Beschichtung exemplarisch mit einer speziellen SEEC-Mikroskopiertechnik (SEEC – surface-enhanced ellipsometric contrast) untersucht. Dabei werden die Substrate in einem bestimmten Belichtungswinkel mit einem konventionellen invertierten, hochauflösenden Lichtmikroskop vermessen.^{xxi} Die SEEC-Substrate bestehen aus mehreren dielektrischen Schichten, deren Dicken und Brechungsindizes so gewählt werden, dass der Polarisationszustand des eingestrahnten Lichtes nach der Reflektion unverändert bleibt.^{198,199} Mit zwei orthogonalen Polarisatoren, von denen einer in den Strahlengang vor und der andere nach der Reflektion platziert ist, kann die Oberfläche als entspiegelt betrachtet werden. Falls nun das SEEC-Substrat mit einem molekularen Film versehen wird, ändern sich die Polarisationsseigenschaften des gesamten Systems. In der Folge können Intensitätsänderungen des Lichts am Analysator detektiert werden, welche lediglich von den beschichteten Nanomaterialien resultieren. Im Vergleich zur konventionellen Hellfeldmikroskopie kann durch die Verwendung der SEEC-Substrate eine 100-fache Kontrastverstärkung erzielt werden, wodurch letztlich ultradünne

^{xxi} Die SEEC-Messungen wurden im Rahmen von Testmessungen von Herrn Nicolas Medard bei der Firma NANOLANE (Le Mans, Frankreich) durchgeführt.

Schichten analysiert werden können.¹⁹⁹ Die Methode erlaubt weiterhin, wie in Abbildung 6—6 dargestellt, ein 2D-Mapping der betrachteten Probe. Der pseudo-colorierte Ausschnitt zeigt hierbei die Anwesenheit von ovalen und sphärischen Strukturen, die vermutlich von aufgetrockneten Lösungsmitteltropfen stammen. Ferner befinden sich auf dem Substrat Bereiche mit Schichtdicken zwischen 15 und 25 nm neben nahezu vollständig unbeschichteten Regionen mit weniger als 5 nm. Diese Untersuchungen demonstrieren damit im Gegensatz zu den Ellipsometermessungen keine homogene Beschichtung der Proben. Des Weiteren liegen für die SEEC-Technik die maximal gemessenen Schichtdicken bei lediglich 20 nm, wohingegen in Abbildung 6—5 eher von 70 – 80 nm ausgegangen wird. Die Diskrepanz der Untersuchungen könnte eventuell durch die Verwendung der speziellen SEEC-Substrate erklärt werden, welche eine Siliziumdioxid-Deckschicht (SiO_2) aufweisen. Sämtliche, in dieser Arbeit vorgestellten, Beschichtungen wurden hingegen standardmäßig auf polierten Plättchen aus Reintitan oder einer Titanlegierung (TiAl6V4) durchgeführt und anschließend ellipsometrisch vermessen. Aufgrund der eingeschränkten Reflektivität der SEEC-Substrate konnten die Schichtdicken nach der Sprühbeschichtung nicht im Institut für Technische Chemie am Ellipsometer überprüft werden. Abgesehen von der Diskrepanz der Schichtdicke muss jedoch konstatiert werden, dass die ellipsometrisch bestimmten Werte eine Homogenität suggerieren, welche durch die SEEC-Messungen nicht bestätigt werden konnten.

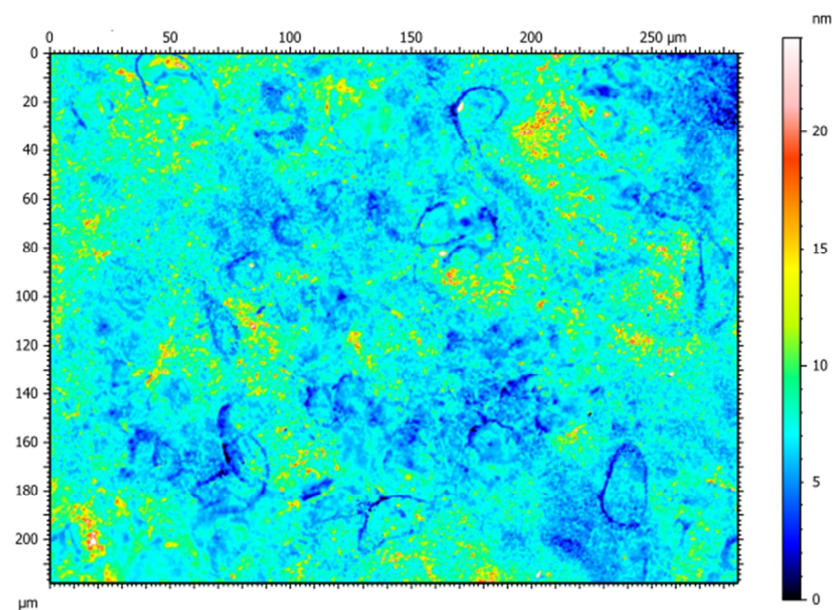


Abbildung 6—6 Pseudo-colorierte Hellfeldaufnahme der CS-83/TPP-Beschichtung auf SiO_2 -SEEC-Substrat (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 µL. Die Messung wurde mit 50-facher Vergrößerung unter Verwendung der Sarfus HR Station durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit dem Programm Sarfusoftware 3.1.

Als Erklärung für die große Schichtdickendifferenz zwischen Ellipsometrie und SEEC können die unterschiedlichen Messtechniken der Methoden angeführt werden. Bei der Ellipsometrie wird die Schichtdicke über einen größeren Bereich von einigen Quadratmillimetern gemittelt, sodass geringe Inhomogenitäten der Oberfläche nicht aufgelöst werden können. Bei der SEEC lassen sich hingegen durch die Analyse kleinerer Areale ($250\text{ }\mu\text{m} \times 250\text{ }\mu\text{m}$) deutlich höhere Auflösungen erzielen. Um die Schichtdickenunterschiede zu untersuchen und eine eventuelle Abhängigkeit vom Substratmaterial festzustellen, wurden zusätzlich CS/TPP-Nanopartikelbeschichtungen auf Silizium-Plättchen mit einer SiO_2 -Oberfläche (Si/SiO_2) durchgeführt und mittels Ellipsometrie vermessen. Die im Anhang 10-2 gezeigten Schichtdicken weisen wiederum auf eine gute Reproduzierbarkeit der Beschichtungen hin. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Schichtdicken für alle CS/TPP-Nanopartikelbeschichtungen auf Si/SiO_2 im Vergleich zum Titansubstrat etwa 10 – 20 nm geringer sind. Diese Diskrepanz könnte mit den unterschiedlichen Rauigkeiten der Substrate zusammenhängen. Da die Siliziumwafer gegenüber den polierten Titanplättchen eine deutliche glattere Oberfläche besitzen, wäre die Adhäsion der Nanopartikel auf dem Material vermutlich weniger stark ausgeprägt. Zusätzlich wurden die Zetapotentiale der Substratoberflächen, TiO_2 und SiO_2 , verglichen, um die elektrostatische Wechselwirkung der Partikel mit der Oberfläche abschätzen zu können. In der Veröffentlichung von KAMADA et al. konnten verschiedene Oxide wie TiO_2 , SiO_2 und ZnO (Zinkoxid) in wässriger Umgebung elektrochemisch charakterisiert werden. Dabei wurde TiO_2 als Mischung der Anatase-, Rutil- und amorphen Kristallstruktur verwendet. Es konnten bei pH 7 keine gravierenden Zetapotentia-Unterschiede zwischen TiO_2 (-25 mV) und SiO_2 (-30 mV) beobachtet werden.²⁰⁰ Die unterschiedlichen Schichtdicken können demnach nicht auf eine gesteigerte elektrostatische Anziehung der CS-83/TPP-Partikel auf einer der Substratoberflächen zurückgeführt werden.

Mit den CS/TPP-beschichteten Titansubstraten wurden in der Folge Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die Probekörper für eine definierte Zeit in Reinstwasser mit und ohne Zugabe von Lysozym ($1,5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert. Die erhaltenen Resultate sind in Abbildung 6—7 veranschaulicht und zeigen die von POTH beschriebene Stabilitätsproblematik der CS-58/TPP-Nanopartikel.^{93,115} Unabhängig vom betrachteten Inkubationsmedium nehmen die Schichtdicken bereits nach vier Stunden von initialen 80 nm auf ungefähr die Hälfte ab. Eine anschließende gleichbleibende Verringerung während des

Zeitraums bis 161 Stunden führt letztlich zu Schichtdicken von etwa 20 nm. Im Gegensatz dazu können bei den CS-83/TPP- und CS-72/TPP-Beschichtungen im Rahmen des Fehlers nahezu keine Veränderungen der Schichtdicken festgestellt werden. Die anfänglichen Werte von 80 nm bleiben über den betrachteten Inkubationszeitraum weitestgehend konstant, sodass von einer nicht stattfindenden bzw. einer stark verlangsamten Degradation ausgegangen werden kann.

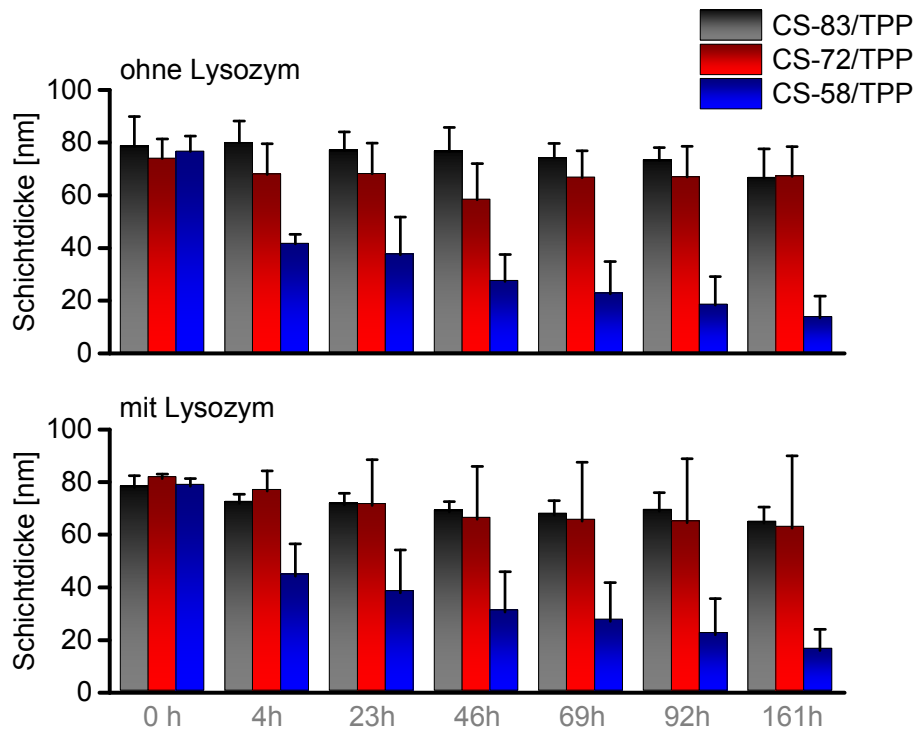


Abbildung 6—7 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Inkubation der mit CS/TPP-Nanopartikeln (CS-83, CS-72 und CS-58) beschichteten TiAl6V4-Substrate (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1) in Reinstwasser mit und ohne Zugabe von 1,5 µg/mL Lysozym. Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 µL. n = 3.

Die Degradation der CS-58/TPP- und der CS-83/TPP-Beschichtungen wurden zusätzlich mittels Quarzkristallmikrowaage beobachtet. Durch diese in Kapitel 5.5 auf Seite 55 vorgestellte Messtechnik lassen sich kleinste Masseänderungen auf einem Quarzkristallsensor quantifizieren, die als Folge von Adsorptions- oder Desorptionsprozessen auftreten können. Das CS-83/TPP-System wurde nach standardisierten Bedingungen hergestellt und per Sprühbeschichtung auf einen, mit Titan bedampften, Quarzkristall aufgebracht. Anschließend wurde das präparierte Substrat in der Messzelle platziert und mit Wasser gespült, bis eine konstante Grundlinie erhalten werden konnte. Danach wurde der Sensor zunächst mit einer 2,5 mg/mL-konzentrierten Lysozymlösung gespült. Während dieser Inkubation wurde für die nicht-degradable CS-83/TPP-Beschichtung keine signifikante Masseänderung erwartet, die durch eine Frequenzänderung erkennbar gewesen wäre. Wie

in Abbildung 6—8 gezeigt, verändert sich die Grundlinie infolge der Spülprozesse mit Wasser und der wässrigen 2,5 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung kaum. Selbst bei Verwendung einer 50 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung konnte keine große Frequenzverschiebung beobachtet werden. Dieser Befund weist auf eine gegenüber Lysozym stabile Beschichtung hin und bestätigt die Ergebnisse der Degradationsversuche in Lösung (per DLS, siehe Abbildung 6—4) und auf den Titansubstraten (per Ellipsometer, siehe Abbildung 6—7). Die Schichtdickenauswertung erfolgte nach dem in Kapitel 5.5 auf Seite 55 vorgestellten SAUERBREY-Modell für harte und trockene Filme aus der Änderung der Masse. Dabei wurde eine Schichtdickenabnahme von $0,4 \pm 0,5$ nm beobachtet, die einer Frequenzänderung von etwa 10 Hz entspricht. Die Ergebnisse der ellipsometrischen Messungen mit einer Schichtdickenänderung von 2 ± 1 nm, ausgehend von einer anfänglichen Schichtdicke von 75 ± 8 nm, stehen mit den QCM-Resultaten im Einklang. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die CS-83/TPP-Beschichtungen unter den gewählten Inkubationsbedingungen als stabil gelten.

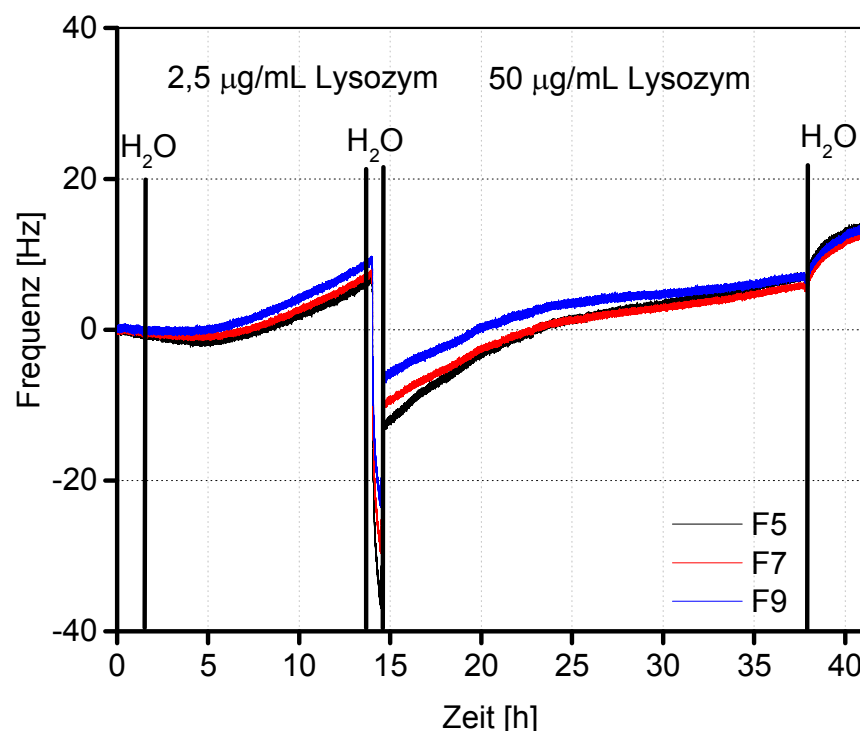


Abbildung 6—8 Frequenzverschiebung von CS-83/TPP-beschichteten QCM-Sensoren während der Inkubation in Wasser und wässriger Lysozymlösung (2,5 µg/mL und 50 µg/mL). Dargestellt sind die Frequenzobertöne F5, F7 und F9. Die y-Achse ist von -40 bis 40 Hz skaliert.

Analoge Untersuchungen wurden mit dem biodegradablen CS-58/TPP-System durchgeführt. Die Frequenzänderungen als Folge der Inkubation in Wasser und einer 2,5 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung sind in Abbildung 6—9 illustriert. Es wird darauf hingewiesen,

dass die Frequenz auf der y-Achse mit -200 bis 800 Hz eine andere Skalierung besitzt als in Abbildung 6—8. Bereits das initiale Spülen der Messzelle mit Wasser gestaltete sich schwierig, da die Grundlinie aufgrund der partiellen Löslichkeit des CS-58 nicht konstant war. Es wird kontinuierlich Masse von der Oberfläche abgetragen, was sich in einer positiven Frequenzverschiebung manifestiert. Wie in Abbildung 6—7 gezeigt, resultiert bereits in Gegenwart von Reinstwasser eine Schichtdickenabnahme. Nach 18 Stunden Inkubationszeit wurde mit der 2,5 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung gespült, wodurch ein sehr großer Frequenzshift von etwa 250 Hz beobachtet werden konnte. Dieser Befund kann durch eine deutlich schnellere Auflösung bzw. Degradation der CS-58/TPP-Beschichtung erklärt werden. Es konnte damit bestätigt werden, dass Lysozym eine katalysierende Wirkung auf den Abbau der Schichten hat. Unter Verwendung der SAUERBREY-Auswertung ergibt sich für die QCM-Messung eine Abnahme von 43 ± 5 nm, während bei den ellipsometrischen Messungen ausgehend von einer initialen Schichtdicke von 76 ± 6 nm eine Schichtdickenänderung von 21 ± 6 nm resultiert. Die Diskrepanzen dieser Untersuchung könnten auf der Tatsache beruhen, dass bei der QCM gequollene, feuchte Filme vermessen werden und das für die Auswertung herangezogene SAUERBREY-Modell nur für harte und trockene Filme gilt.²⁰¹ Bei den ellipsometrischen Messungen werden hingegen nicht-gequollene Filme untersucht, die deutlich geringere initiale Schichtdicken und absolute Schichtdickenänderungen aufweisen als gequollene Filme. Nichtsdestotrotz kann aus den durchgeführten Experimenten erneut abgeleitet werden, dass der Deacetylierungsgrad des Chitosans einen wichtigen Einfluss auf die Degradierbarkeit dieses Polysaccharids besitzt. Mit den CS-83/TPP-Nanopartikeln konnte demnach ein System gefunden werden, welches eine hohe Stabilität gegenüber Wasser und wässrigen Lösungen des Enzyms Lysozym aufweist. Die CS-58/TPP-Partikel hingegen können als biodegradierbares Pendant verstanden werden.

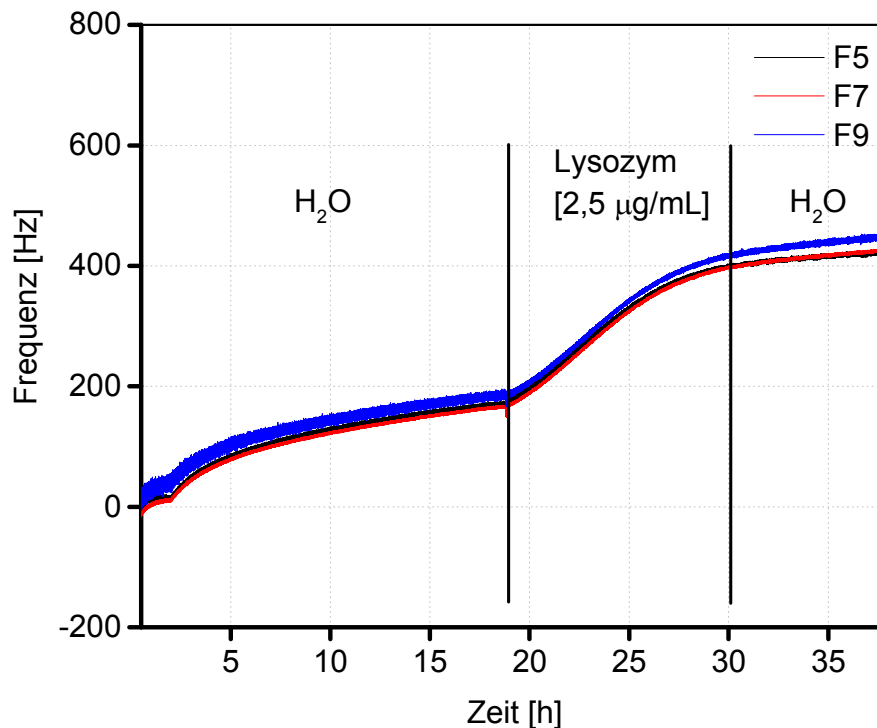


Abbildung 6—9 Frequenzverschiebung von CS-58/TPP-beschichteten QCM-Sensoren während der Inkubation in Wasser und wässriger Lysozymlösung (2,5 µg/mL). Dargestellt sind die Frequenzobertöne F5, F7 und F9. Die y-Achse ist von -200 bis 800 Hz skaliert.

Die Beschichtungen wurden auch in einem komplexen Medium inkubiert. Durch die Verwendung von Standardzellkulturmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium – DMEM) sollte die Beständigkeit der Beschichtungen in Gegenwart physiologischer Bedingungen getestet werden. Zusätzlich wurde der Einfluss von fötalem Kälberserum (FBS) auf die CS/TPP-Beschichtungen untersucht, da von POTH vermutet wurde, dass dieses signifikante Mengen an Lysozym enthält.¹¹⁵ Für das Inkubationsexperiment wurden zunächst jeweils drei Titansubstrate mit den CS/TPP-Nanopartikeln per Sprühbeschichtung versehen. Wie in Abbildung 6—10 zu erkennen, konnten dabei Schichtdicken von etwa 70 nm (CS-58/TPP) bis zu 80 nm (CS-83/TPP) erhalten werden. Anschließend erfolgte die Inkubation in DMEM mit und ohne FBS, verbunden mit ellipsometrischen Schichtdickenmessungen nach 4 und 23 Stunden. Unabhängig von der FBS-Zugabe konnten für die drei CS/TPP-Beschichtungen ähnliche Trends beobachtet werden. Nach 4 Stunden Inkubationszeit kann eine Schichtdickenabnahme für das CS-58/TPP-Substrat auf etwa 15 – 30 nm beobachtet werden, während die CS-72/TPP- und CS-83/TPP-Schichten weitestgehend konstant bleiben. Dieser Befund konnte bereits in Abbildung 6—7 während der Inkubation in wässrigem Medium nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Inkubation findet jedoch bei sämtlichen Beschichtungen ein Schichtdickenzuwachs statt, der bei den „DMEM ohne FBS“-Bedingungen vergleichsweise stärker ausgeprägt ist. Zusätzlich konnte ein weißlicher

Schleier auf den Substraten beobachtet werden, der vermutlich von adhären Salzen hervorgerufen wird. Dadurch gestaltete sich die Auswertung der ellipsometrischen Messdaten schwierig. Die Fits zur Bestimmung der Schichtdicke überstiegen häufig die voreingestellten Grenzen des Brechungsindex' und der Schichtdicke. Nichtsdestotrotz konnte eine signifikante Schichtdickenzunahme berechnet werden, die in etwas geringerem Maße auch bei den „DMEM mit FBS“-Bedingungen festgestellt werden konnte. Interessanterweise konnte bei diesen Substraten kein weißlicher Film beobachtet werden, sodass die ellipsometrische Bestimmung der Schichtdicken deutlich einfacher durchgeführt werden konnte. Letztlich konnte jedoch kein großer Unterschied zwischen den Inkubationen in DMEM mit und ohne FBS beobachtet werden. Die Präsenz von Lysozym in FBS konnte damit nicht abschließend geklärt werden.

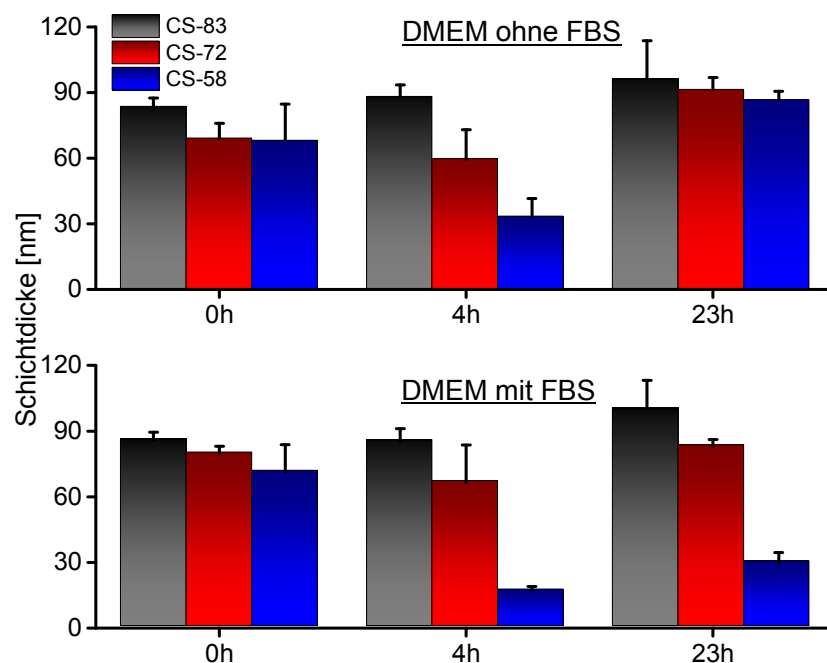


Abbildung 6—10 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Inkubation der mit Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikeln (CS-83, CS-72 und CS-58) beschichteten TiAl6V4-Substrate (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1) in DMEM mit und ohne Zugabe von fötalem Kälberserum (FBS). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 3.

Zusammenfassend muss die Beständigkeit der CS-58/TPP-Beschichtungen sowohl in Wasser als auch in komplexen Medien, wie DMEM, in Frage gestellt werden. Die in Kapitel 6.1.1 aufgezeigte ausreichende Stabilität der CS-58/TPP-Nanopartikel Suspension, die durch Dynamische Lichtstreuexperimente überprüft wurde, konnte für die Beschichtung nicht bestätigt werden. Demgegenüber scheinen die CS-72/TPP- und CS-83/TPP-Beschichtungen durch die geringere Wasserlöslichkeit der Chitosan-Komponenten deutlich stabiler zu sein.

6.1.3 Einlagerungsstudien mit IFN β

Die Einkapselung und Freisetzung von Wirkstoffen ist ein essentieller Schritt für die potentielle Verwendung der Nanopartikel als Drug-Delivery-System. Als Modellwirkstoff wurde das in Kapitel 4.3 vorgestellte Protein Interferon- β (IFN β) verwendet, für das sehr sensitive Nachweismethoden existieren, die im Labor der Kooperationspartner am HZI etabliert sind.

Zunächst wurden Einlagerungsstudien mit *nicht-kommerziellem* IFN β ^{xxii} durchgeführt, indem eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen des Proteins hergestellt und mit einem Biolumineszenzassay^{xxiii} vermessen wurde. Mithilfe der Verdünnungsreihe wurde eine Ausgleichsgerade erstellt, aus welcher die Menge an freiem IFN β berechnet werden konnte. Zunächst wurde eine bekannte Menge an IFN β in die CS/TPP-Nanopartikel eingelagert, indem das Protein während der Nanopartikelpräparation hinzugegeben wurde. Anschließend wurde ein Sedimentationsschritt eingeführt, um die beladenen Nanopartikel von nicht-eingelagertem IFN β zu separieren. Die Analyse des Überstandes erfolgte mithilfe des auf Seite 192 beschriebenen Luciferase-Tests. Über Gleichung 10 wurden dann die Einkapselungseffizienzen (ee) in Prozent aus den gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU – relative light units), bestimmt.

$$ee [\%] = \frac{\text{gemessene RLU (Partikel + IFN}\beta\text{)}}{\text{gemessene RLU (freies IFN}\beta\text{)}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 10}$$

In Abbildung 6—11 sind die berechneten Einkapselungseffizienzen von IFN β in CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Nanopartikeln dargestellt. Bei einem Gesamtvolumen von 0,5 mL wurden entweder 5 μ L und 25 μ L der Partikelsuspensionen (CS/TPP + IFN β) auf die Mx2Luc2-Reporterzellen gegeben, um zusätzlich den Einfluss der Proteinkonzentration zu untersuchen. Die Aktivität der IFN β -Stammlösung lag bei 10.700 Units pro Milliliter (U/mL).

^{xxii} Das *nicht-kommerzielle* IFN β wird im HZI rekombinant durch eine entsprechende Zelllinie hergestellt. Das Protein wird in den Zellüberstand sekretiert, und ohne Aufreinigung (Anwesenheit von Proteasen, Zellkulturmedium, etc.) verwendet.

^{xxiii} Zellassay, der im experimentellen Teil in Kapitel 8.5.10 auf Seite 205 beschrieben wird.

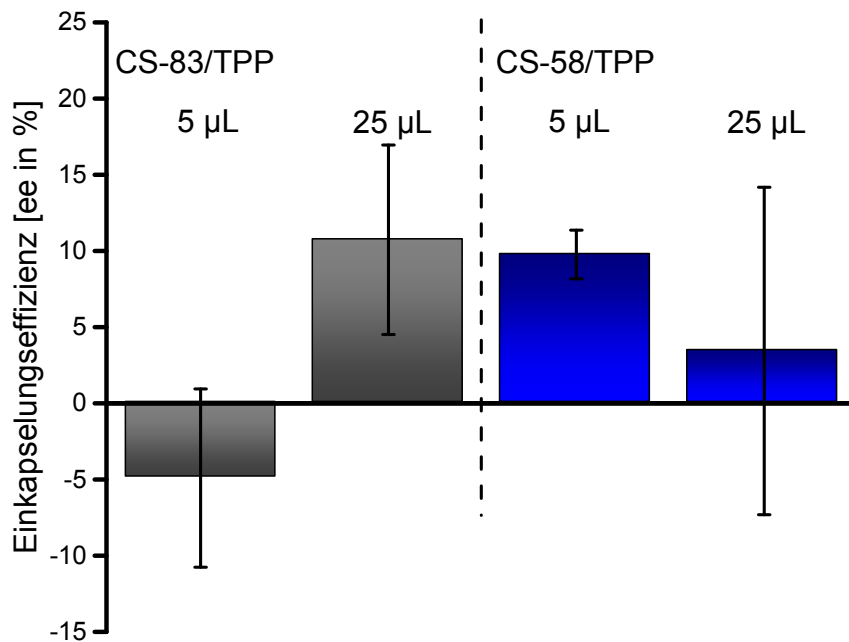


Abbildung 6—11 Vergleich von CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Nanopartikeln mit *nicht-kommerziellem* IFN β (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, Stammlösung von 10.700 U/mL IFN β). Die Nanopartikel wurden für 15 min bei 16.800 Umdrehungen pro Minute sedimentiert. Für den Luciferase-Assay wurden von den Überständen 5 und 25 µL auf die Mx2Luc2-Zellen gegeben. n = 3.

Aus Abbildung 6—11 kann entnommen werden, dass sich die Einkapselungseffizienzen, unabhängig vom Deacetylierungsgrad des Chitosans oder von der IFN β -Konzentration, in einem niedrigen Bereich von -5 % bis etwa 10 % bewegen. Hierbei stellen die Einlagerungseffizienzen von bis zu 10 % bei den „CS-83/TPP (+25 µL IFN β)“- und bei den „CS-58/TPP (+5 µL IFN β)“-Formulierungen die höchsten Werte dar. Auffällig ist zudem der negative Wert für die „CS-83/TPP (+5 µL IFN β)“-Formulierung, welche auf eine höhere Proteinkonzentration im Überstand verglichen mit der Verdünnungsreihe hindeuten würde. Angesichts der großen Standardabweichungen sollte die Reproduzierbarkeit dieser Experimente jedoch angezweifelt werden.

Dieser Befund könnte mit dem verwendeten *nicht-kommerziellen* IFN β erklärt werden, welches nicht von Proteinrückständen und anderen Kontaminationen befreit wird. Anhand der in Abbildung 6—12 gezeigten Messung der Dynamischen Lichtstreuung für das *nicht-kommerzielle* IFN β und für die entsprechende CS-58/TPP-Partikelformulierung wird deutlich, dass die Verunreinigungen bei der Einlagerung berücksichtigt werden müssen. Wird die Partikelgrößenverteilung des *nicht-kommerziellen* IFN β in Abbildung 6—12b betrachtet, fällt die Multimodalität der Probe auf, die auf die Anwesenheit von unterschiedlich großen Spezies in der Lösung hindeutet. Das Protein IFN β mit einer Größe von 22,6 kDa sollte einen Durchmesser von wenigen Nanometern besitzen.²⁰² Die weiteren Signale über 10 nm und im

Bereich von 100 – 200 nm stammen vermutlich von Verunreinigungen, die während des Herstellungsprozesses entstehen. Die diversen, nicht-identifizierbaren Kontaminationen könnten die Einkapselung des IFN β in die CS/TPP-Nanopartikel nachteilig beeinflussen. Abbildung 6—12c zeigt die Partikelgrößenverteilung der CS-58/TPP-Formulierung in Kombination mit *nicht-kommerziellem* IFN β . Aus der erhaltenen multimodalen Verteilung kann konstatiert werden, dass die im Überschuss vorliegenden Partikel die IFN β -Signale nicht kompensieren können. Neben dem CS-58/TPP-Partikelpeak bei etwa 200 nm lassen sich weiterhin Signale zwischen 8 und 50 nm detektieren, die auf freies Protein und Kontaminationen hinweisen könnten. Im Kontext der Limitierungen der Dynamischen Lichtstreuung wurde bereits erwähnt, dass die Streulichtintensität etwa mit der sechsten Potenz des der untersuchten Partikel Durchmessers zunimmt.²⁰³ Eine Partikelpopulation mit einer Größe von 10 nm würde demzufolge nur etwa 1/1.000.000 der Streulichtintensität einer Größengruppe von 100 nm aufweisen. Damit wird deutlich, dass eine signifikante Anzahl der Partikel im Bereich von 8 – 50 nm in der Suspension vorliegt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde die Einkapselung optimiert, indem *kommerziell erhältliches* und besser aufgereinigtes IFN β mit einer definierten Aktivität von $2,8 \times 10^6$ U/mL verwendet wurde.

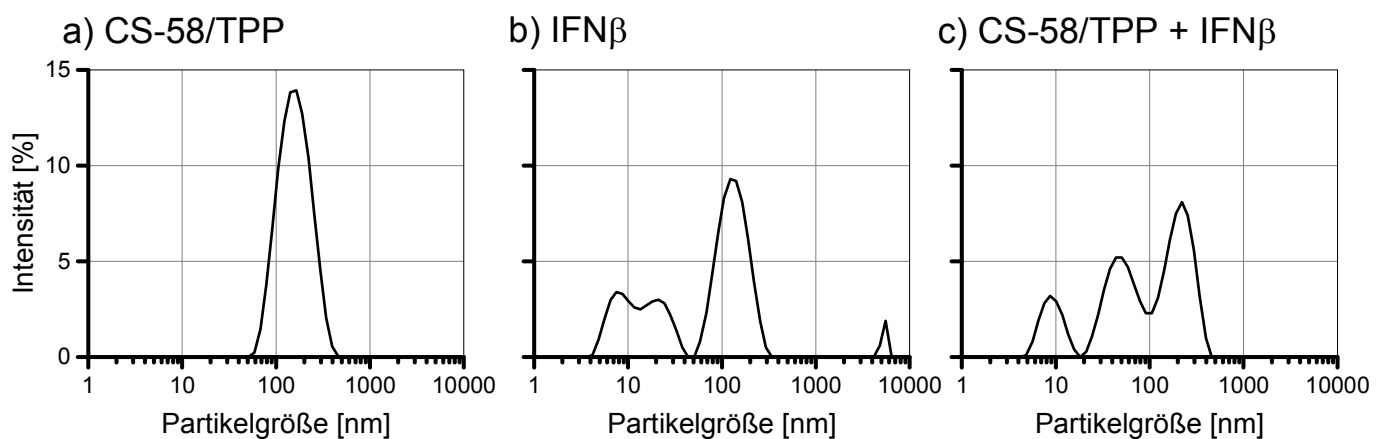


Abbildung 6—12 Intensitätsverteilungen von a) CS-58/TPP-Nanopartikeln, b) *nicht-kommerziellem* IFN β (10.700 U/mL) und c) CS-58/TPP-Partikeln mit *nicht-kommerziellem* IFN β (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, Stammlösung von 10.700 U/mL IFN β).

Die Verwendung des *kommerziellen* IFN β vereinfacht die Präparation der beladenen Nanopartikel und erlaubt eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Das von PBL ASSAY SCIENCE produzierte IFN β wird nach der Herstellung einer Aufreinigung unterzogen, sodass Kontaminationen weitestgehend ausgeschlossen werden können. Die Lieferung in einer Pufferlösung ermöglicht eine einfache Aliquotierung des IFN β . Zudem können durch die

hohe Aktivität des Proteins geringste Volumina der IFN β -Lösung eingesetzt werden. Für die Einkapselung in die CS/TPP-Nanopartikel wurde die IFN β -Stammlösung (Aktivität von $2,8 \times 10^6$ U/mL) auf 500, 1.000, 2.500 und 5.000 U/mL verdünnt und während der Partikelpräparation hinzugefügt. Für 500, 1.000 und 2.500 U/mL wurden teilweise negative Einkapselungseffizienzen beobachtet, die auf eine höhere IFN β -Konzentration im Überstand der CS/TPP-Partikel als im Kontrollexperiment ohne Nanopartikel hindeuteten. In diesem Fall wurden negative Einkapselungseffizienzen erhalten. Lediglich für die 5.000 U/mL konnten wiederholt realistische Einkapselungseffizienzen von etwa 22 ± 11 % für die CS-83/TPP- und 12 ± 7 % für die CS-58/TPP-Formulierung erhalten werden.

Sämtliche weiteren Versuche im Hinblick auf Freisetzungsstudien wurden mit derselben IFN β -Konzentration von 5.000 U/mL durchgeführt. Durch die Verwendung des *kommerziellen* IFN β konnten damit die Einkapselungseffizienzen im Vergleich zu dem *nicht-kommerziellen* IFN β ungefähr verdoppelt werden. Nichtsdestotrotz sind die Einkapselungseffizienzen hier deutlich niedriger als die von POTH mit dem CS-58/TPP-System und BMP-2 erhaltenen Effizienzen, die über 90 % lagen.⁹³

Dieser Befund könnte mit den natürlichen Bindungspartnern von BMP-2 und IFN β erklärt werden. BMP-2 weist als Knochenwachstumsfaktor Bindungsstellen für EZM-lokalisierte Glykosaminoglykane (GAGs) wie Heparin, Heparansulfat oder Kollagen auf.²⁰⁴ Durch die strukturelle Verwandtschaft der GAGs zu dem Polysaccharid Chitosan könnte möglicherweise eine Adsorption des BMP-2 auch in dem von POTH untersuchten CS-58/TPP-System erfolgt sein.⁹³ IFN β hingegen wirkt im Körper als Botenstoff und besitzt keine Bindungsdomäne für GAGs, d.h. es wechselwirkt vermutlich deutlich schlechter mit dem Chitosan als das BMP-2. Außerdem gilt IFN β als hydrophobes Protein, welches laut GRUBER-TRAUB et al. nur mit stabilisierenden Substanzen wie humanem Serumalbumin oder Mannitol in Lösung gehalten werden kann.²⁰⁵ Die Hydrophobizität des IFN β und die nur geringe Wechselwirkung mit Polysacchariden könnten demnach die niedrigen Einkapselungseffizienzen von etwa 10 – 20 % für die CS/TPP-Partikel bei 5.000 U/mL erklären.

6.1.4 Freisetzungsstudien aus CS-58/IFN β /TPP-Beschichtungen^{xxiv}

Für die Evaluierung der Freisetzungskinetik der CS-58/TPP-Nanopartikelformulierungen mit dem Modellwirkstoff IFN β wurden polierte Titansubstrate (Reintitan, medizinische Qualität 4) sprühbeschichtet. Für sämtliche Untersuchungen wurde *kommerzielles IFN β* mit einer Aktivität von 5.000 U/mL verwendet, das durchschnittliche Beschichtungsvolumen betrug 20 μ L (entspricht etwa 0,02 mg). Anschließend wurden die beschichteten Substrate am HZI in Standardzellkulturmedium (DMEM) mit und ohne fötalem Kälberserum sowie PBS ausgelagert. Nach definierten Zeitpunkten von 30 min, 2 h und 20 h wurde ein 0,1 mL Aliquot entnommen und 1:10 mit DMEM verdünnt. 0,5 mL der Lösung wurden für 24 h auf die Mx2Luc2-Zellen gegeben und anschließend durch den in Kapitel 8.5.10 auf Seite 192 beschriebenen Luciferase-Test analysiert.

Mithilfe dieses Experiments sollte die Stabilität der Beschichtungen in physiologisch relevanten Inkubationsmedien beurteilt werden. Bei denen in Abbildung 6–13 dargestellten Ergebnissen der Freisetzungsexperimente wird der „Fold-Induction-Wert“, also der Quotient aus gemessener Intensität und Basalwert der MxLuc2-Zelllinie, gegen die Inkubationsdauer der beschichteten Plättchen aufgetragen. Der Basalwert wird als Grundlumineszenz der MxLuc2-Zellen in Abwesenheit von IFN β definiert und dient zusätzlich als Kontrolle bei der Evaluation der Resultate. Da in den Inkubationsmedien die Präsenz des Enzyms Lysozym ausgeschlossen werden konnte, sollten die Beschichtungen nicht spezifisch degradiert werden. Da allerdings bereits anhand der in Abbildung 6–10 auf Seite 70 gezeigten Daten infolge der Abnahme der Schichtdicke eine Labilität des CS-58/TPP-Systems vermutet wurde, gilt eine vorzeitige Freisetzung von IFN β als sehr wahrscheinlich. Wie aus Abbildung 6–13 entnommen werden kann, ist der „Fold-Induction-Wert“ als Folge der Inkubation der beschichteten Plättchen im Zellkulturmedium DMEM, unabhängig von FBS, nach 2 h deutlich gesteigert. Dieser Sachverhalt lässt sich vermutlich auf die unspezifische Freisetzung von IFN β zurückführen, die mit der Labilität der CS-58/TPP-Beschichtungen einhergeht. In Anbetracht der Standardabweichungen ist hierbei vor allem bei der Kondition „DMEM/10 % FBS“ lediglich eine qualitative Betrachtung zulässig. Dennoch scheinen die Materialien in Gegenwart von PBS über den betrachteten Zeitraum von 20 h weitestgehend stabil zu sein. Zudem kann eine stetige Abnahme des „Fold-Induction-Wertes“ während der

^{xxiv} Sämtliche IFN β -Freisetzungsexperimente wurden zusammen mit Herrn Jan Riedel (M.Sc.) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

Inkubationszeit beobachtet werden, obwohl kein Medienwechsel stattfand. Unter diesen Bedingungen ist eigentlich eine Akkumulation des IFN β zu erwarten, dessen Konzentration letztlich gegen einen Grenzwert tendieren sollte. Durch entsprechende Kontrollmessungen konnte jedoch eine signifikante Abnahme der IFN β -Aktivität über 48 h festgestellt werden, die mit der unzureichenden Stabilität des Proteins erklärt werden kann (siehe Anhang 10-3).²⁰⁶

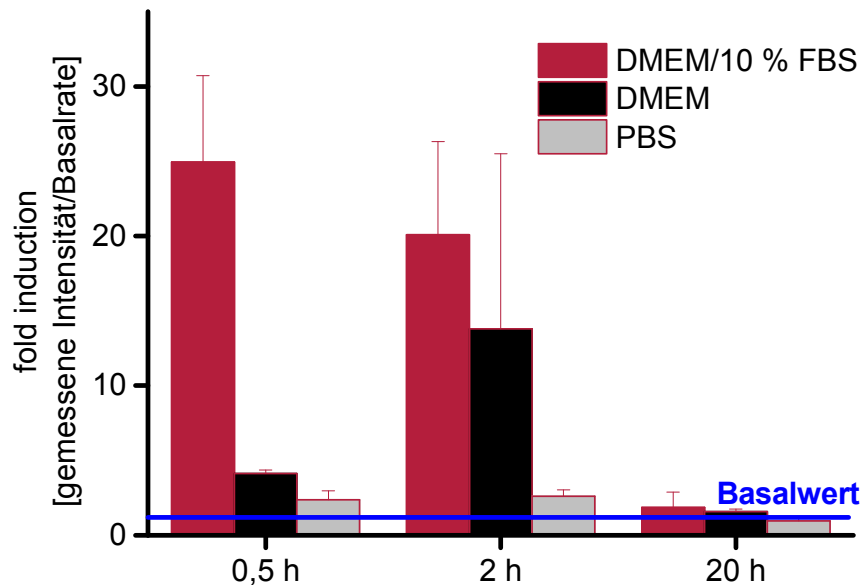


Abbildung 6—13 Fold-Induction-Werte (gemessene Intensität/Basalwert der Mx2Luc2-Zellen) der mit CS-58/IFN β /TPP-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in DMEM/10 % FBS; DMEM und PBS (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, 5.000 U/mL IFN β). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 3.

Die hohe Freisetzungsrates des IFN β in Gegenwart von Zellkulturlösungen könnte möglicherweise auf das Vorhandensein von mehrwertigen Fremdionen zurückgeführt werden, welche eventuell eine höhere Affinität zu Chitosan besitzen als TPP. In der Folge würde es zu einem Ionenaustausch verbunden mit einer Umlagerung der Beschichtung kommen, die letztlich zu der vermehrten Freisetzung von IFN β führen könnte. Bei den Untersuchungen in Gegenwart von PBS konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden, obwohl die Schichtdicke der Filme laut Abbildung 6—7 auf Seite 66 während der Inkubation in Wasser abnimmt. So kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass sich die CS-58/TPP-Filme nur vom Titansubstrat ablösen, aber nicht auflösen lassen.

Der Einfluss von Lysozym auf die CS-58/TPP-Beschichtungen wurde untersucht, indem die Inkubationsmedien mit 1,5 μ g/mL des Enzyms versetzt wurden. Exemplarisch ist die Änderung des „Fold-Induction-Wertes“ in Abbildung 6—14 für die Auslagerungen in PBS dargestellt. Hierbei konnte kein signifikanter zusätzlicher enzymbedingter Anstieg der IFN β -

Freisetzung festgestellt werden, obwohl die Mittelwerte jeweils etwas höher lagen. Es kann also nicht nachgewiesen werden, dass Lysozym die Freisetzung steuert.

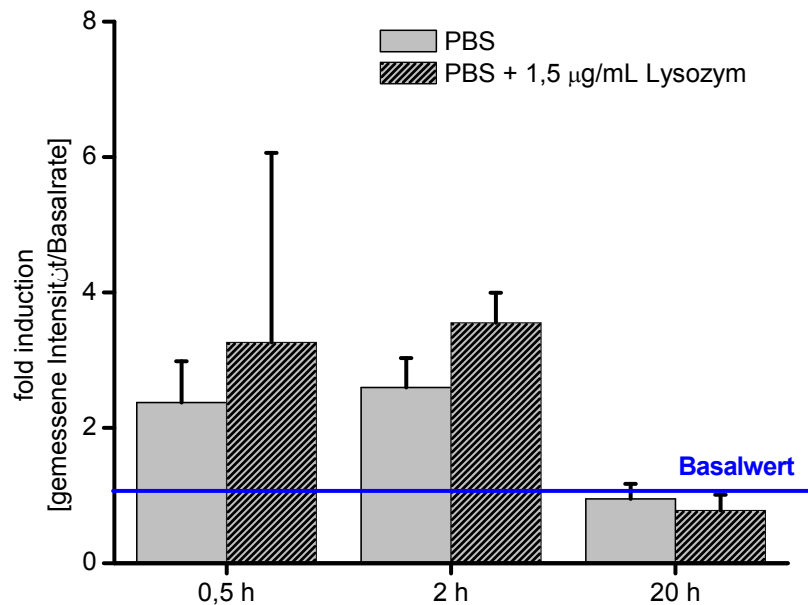


Abbildung 6—14 Fold-Induction-Werte (gemessene Intensität/Basalwert der Mx2Luc2-Zellen) der mit CS-58/IFN β /TPP-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in PBS mit und ohne Zugabe von Lysozym (1,5 µg/mL) (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, 5.000 U/mL IFN β). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 µL. n = 3.

Um die vermutete Labilität der Beschichtungen in Gegenwart von hohen Ionenkonzentrationen näher zu untersuchen, wurden weitere IFN β -Freisetzungsexperimente in deionisiertem Wasser durchgeführt. Durch die Abwesenheit von multivalenten, komplexierenden Ionen sollte eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung weitestgehend vermieden werden können. Erst nach einer Zugabe von Lysozym wäre ein Enzym-initiiertes Release zu erwarten. In der Abbildung 6—15 sind die zugehörigen „Fold-Induction-Werte“ der CS-58/IFN β /TPP-Beschichtungen in deionisiertem Wasser mit und ohne Lysozym dargestellt. Aus den Experimenten wird deutlich, dass die Freisetzung von IFN β unter Wasser-Konditionen gegenüber PBS leicht gesteigert ist. Dennoch bewegen sich die Werte im Rahmen der Standardabweichungen auf ähnlichem Niveau und suggerieren eine ausreichende Stabilität. Da in vorhergehenden Experimenten, die in Abbildung 6—7 auf Seite 66 illustriert sind, die Schichtdickenabnahme als Konsequenz der Inkubation in Wasser beobachtet werden konnte, wird auch hier ein Ab- und kein Auflösen der Schichten vermutet. Infolge der Zugabe von **100 µg/mL** Lysozym, also der 65-fachen Konzentration gegenüber den Standardbedingungen, kann jedoch ein um den Faktor 3 erhöhter „Fold-Induction-Wert“ beobachtet werden. Im direkten Vergleich mit Abbildung 6—14, bei der keine Lysozym-bedingte Freisetzung des IFN β eingeleitet werden konnte, lässt sich

schlussfolgern, dass eine signifikante Steigerung des Lysozymgehalts in einem vermehrten IFN β -Release resultiert. In Anbetracht der von FREIER et al. beschriebenen physiologisch relevanten Lysozymkonzentrationen von 1,5 $\mu\text{g/mL}$ wird offensichtlich,¹³¹ dass das durchgeführte Experiment lediglich als eine Art Machbarkeitsnachweis dient.

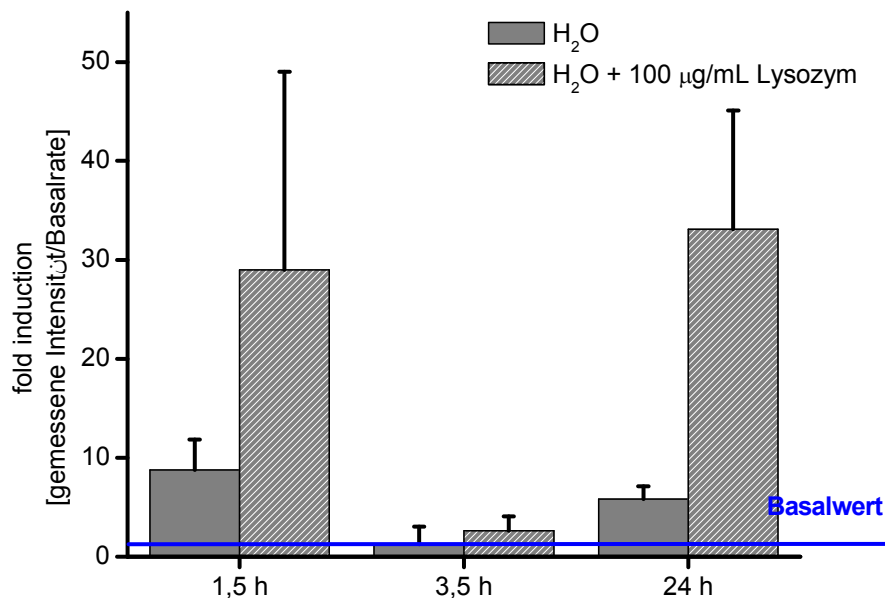


Abbildung 6—15 Fold-Induction-Werte (gemessene Intensität/Basalwert der Mx2Luc2-Zellen) der mit CS-58/IFN β /TPP-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in H₂O mit und ohne Zugabe von Lysozym (100 $\mu\text{g/mL}$) (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, 5.000 U/mL IFN β). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μL . n = 3.

Trotz der gezeigten, ausreichenden Stabilität der Beschichtungen mit CS-58/IFN β /TPP in Wasser und PBS sowie der Enzym-initiierten IFN β -Freisetzung nach Zugabe von Lysozym, erweist sich der unspezifische Release unter Zellkulturbedingungen für einen möglichen *in vivo*-Einsatz als problematisch. Direkt nach der Implantation würde aufgrund der Labilität der Beschichtungen ein Wirkstoffrelease stattfinden, der ein einziges Lumineszenzsignal nach sich ziehen würde. Daher wäre die Untersuchung einer Enzym-bedingten Freisetzung nicht möglich.

Zusätzlich wurden CS-83/IFN β /TPP-Nanopartikelbeschichtungen hergestellt, die eine deutlich größere Stabilität gegenüber Lysozym aufweisen sollten. In den Vorexperimenten (siehe Abbildung 6—7 auf Seite 66 und Abbildung 6—10 auf Seite 70) konnte bereits eindeutig nachgewiesen werden, dass diese Beschichtungen während der Inkubation in Wasser und DMEM eine ausreichende Stabilität besitzen. Analog zu Abbildung 6—15 wurden dann mit CS-83/IFN β /TPP beschichtete Substrate in Wasser inkubiert und 100 $\mu\text{g/mL}$ Lysozym hinzugegeben. Abbildung 6—16 zeigt für alle Messpunkte einen Fold-Induction-Wert von ungefähr 1, der auf sehr wenig beziehungsweise kein freies IFN β hindeutet. Selbst

durch die Zugabe von 100 µg/mL Lysozym konnte keine IFNβ-Freisetzung eingeleitet werden, sodass von einer stabilen Partikelbeschichtung ausgegangen werden kann. Durch diese Ergebnisse konnte einerseits die Stabilität der CS-83/TPP-Beschichtung nachgewiesen werden und andererseits eine Leckage des IFNβ ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse bestätigen jedoch auch, dass die CS-83/IFNβ/TPP-Formulierung aufgrund der fehlenden Degradabilität nicht als Freisetzungssystem geeignet ist.

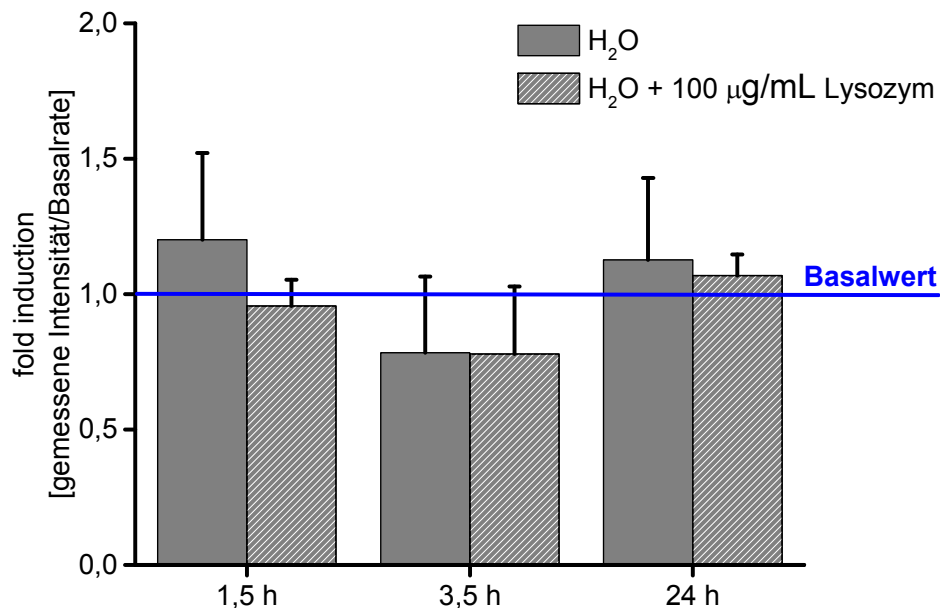


Abbildung 6—16 Fold-Induction-Werte (gemessene Intensität/Basalwert der Mx2Luc2-Zellen) der mit CS-83/IFNβ/TPP-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in H₂O mit und ohne Zugabe von Lysozym (100 µg/mL) (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, 5.000 U/mL IFNβ). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 µL. n = 3.

6.1.5 Einlagerungs- und Freisetzungsstudien mit eGFP

Neben der Inkorporation von IFNβ wurde mit dem fluoreszierenden Protein eGFP (enhanced green fluorescent protein) ein analoger Verkapselungsansatz mit dem CS/TPP-System durchgeführt. Dabei wurde zunächst eGFP zu dem jeweiligen Chitosanderivat (CS-58, CS-72 und CS-83) pipettiert und homogenisiert, bevor letztlich TPP als Crosslinker hinzugegeben wurde. Die Konzentration von eGFP betrug $1,47 \times 10^{-3}$ µmol/mL. Anschließend wurde optional ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (16.800 Umdrehungen pro Minute) durchgeführt, um die Partikel mitsamt des eingelagerten eGFPs zu sedimentieren. Über die Restfluoreszenz im Überstand kann so auf die Einkapselungseffizienz geschlossen werden. Zudem dienen die nicht-zentrifugierten Proben zur Abschätzung der Unversehrtheit des eGFPs nach der Einlagerung in die CS/TPP-Partikel. Im Vergleich mit dem freien eGFP werden ähnliche Fluoreszenzsignale erwartet, die auf die Konservierung der Rotations- und der

Translationsbewegung des eGFPs hindeuten und damit eine intakte Proteinstruktur vermuten lassen.²⁰⁷

Als Kontrollen wurden sowohl CS/TPP-Partikel ohne eGFP, die als Basalwert dienen, als auch eine gleichkonzentrierte eGFP-Lösung in 0,1 % AcOH verwendet. Die Proben wurden in Triplikaten in eine 24-Well-Plate pipettiert und 1:2 mit Reinstwasser verdünnt, bevor die Messung fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge 535 nm erfolgte.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6—17 veranschaulicht und zeigen vor allem bei den drei zentrifugierten CS/TPP-Formulierungen einen deutlichen Unterschied des Fluoreszenzsignals gegenüber der eGFP-Kontrolle und den nicht-zentrifugierten Nanopartikelsuspensionen. Durch den Vergleich zu der eGFP-Kontrolle konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals beim CS-83/eGFP/TPP-System von ungefähr $20 \pm 9 \%$ beobachtet werden, während bei der CS-72/eGFP/TPP-Formulierung sogar eine Verringerung von etwa $30 \pm 6 \%$ festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis deutet auf die Verkapselung des eGFPs hin, welches aufgrund der Sedimentierbarkeit der CS-83/TPP- und CS-72/TPP-Partikel vom Überstand separiert werden konnte. Wird hingegen die CS-58/eGFP/TPP-Formulierung betrachtet, konnte eine Zunahme des Fluoreszenzsignals um etwa $40 \pm 6 \%$ beobachtet werden. Die Ursache dieses Befundes, der eine höhere Aktivität des eGFP in Kombination mit den CS-58/TPP-Partikeln gegenüber dem freien eGFP impliziert, konnte trotz mehrfacher Reproduktion nicht geklärt werden.

Die Resultate bestätigen vorhergehende Untersuchungen von POTH, die eine Abhängigkeit der Sedimentierbarkeit der CS/TPP-Formulierungen vom Deacetylierungsgrad des Chitosans zeigen.¹¹⁵ Dabei wurde herausgefunden, dass CS/TPP-Nanopartikel mit höher deacetylierten Chitosanen stärker zu Sedimentationen neigen. Bei den höher deacetylierten Chitosanderivaten wie CS-83 und CS-72 stehen mehr freie Aminogruppen zur Verfügung, welche in essigsaurer Umgebung protoniert werden können. Daraus resultiert eine deutlich positivere Ladung im Vergleich zum CS-58, welche die Ausbildung von kompakteren, dichten Strukturen mit TPP nach sich zieht. Aufgrund der erhöhten Dichte der CS-83/TPP und CS-72/TPP-Partikel lassen sich diese Partikel durch einen Zentrifugationsschritt leichter sedimentieren.

Weiterhin konnte in dem Experiment gezeigt werden, dass bei sämtlichen nicht-zentrifugierten Proben ähnliche Fluoreszenzsignale wie beim freien eGFP detektiert wurden.

Allerdings konnten gegenüber dem freien eGFP höhere Standardabweichungen beobachtet werden. Die Konservierung des Fluoreszenzsignals weist darauf hin, dass die Mobilität des Proteins durch die Inkorporation weitgehend unbeeinflusst bleibt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Einlagerung des eGFPs in die CS/TPP-Partikel vermutlich keine Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften des Proteins besitzt.

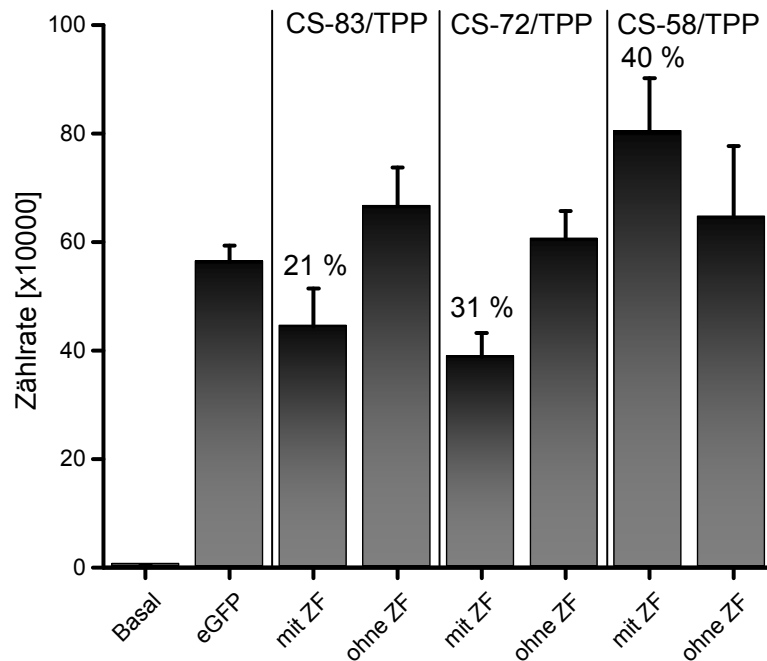


Abbildung 6—17 Fluoreszenzsignale der CS/eGFP/TPP-Formulierungen (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, $1,47 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/mL}$ eGFP) mit und ohne Zentrifugationsschritt (ZF, 15 min, 16.800 Umdrehungen pro Minute). Als Kontrollen wurden CS/TPP-Suspensionen und $1,47 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/mL}$ freies eGFP in 0,1 % AcOH verwendet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Abweichungen zur eGFP-Kontrolle. $n = 3$.

Nach den Zentrifugationsversuchen wurden die erhaltenen Rückstände zunächst zweimal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend in Reinstwasser redispergiert. Nach der fluorometrischen Messung konnten sowohl für die CS-72/eGFP/TPP- als auch für die CS-83/eGFP/TPP-Formulierung etwa 10 % des Fluoreszenzsignals wiedergewonnen werden. In Verbindung mit den in Abbildung 6—17 dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass etwa die Hälfte für das CS-83/eGFP/TPP- und etwa ein Drittel des Fluoreszenzsignals für das CS-72/eGFP/TPP-System beobachtet werden konnte. Etwaige Fluoreszenzverluste können vermutlich auf die Aggregation der Partikel als Konsequenz des Zentrifugationsschrittes zurückgeführt werden. Dadurch ist eine vollständige Redispergierung der Sedimente nicht mehr uneingeschränkt möglich. Die Ergebnisse bescheinigen die erfolgreiche Wechselwirkung des eGFPs mit dem Nanopartikelsystem aus hoch deacetyliertem Chitosan (CS-72 und CS-83) und dem Crosslinker TPP.

Zusätzlich wurden mit den CS/eGFP/TPP-Nanopartikeln Beschichtungsversuche auf Titanplättchen (medizinische Qualität 4) durchgeführt, um eine Freisetzung direkt von der Oberfläche zu simulieren. Die Substrate wurden nach dem Standardprotokoll in einem 3-minütigen Sprühprozess mit durchschnittlich 20 µL der Nanopartikelformulierungen versehen. Im Anschluss wurden die Beschichtungen in 1,5 mL Reinstwasser bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 100 µL des Überstandes entnommen und fluorometrisch vermessen. Zusätzlich wurde eine eGFP-Konzentrationsreihe bei 37 °C inkubiert und zeitgleich untersucht, um die Stabilität des eGFPs bei dieser Temperatur zu überprüfen (siehe Abbildung 6—18). Wird von einem Beschichtungsvolumen von etwa 20 µL und einer anfänglichen eGFP-Konzentration von $1,47 \times 10^{-3}$ µmol/mL ausgegangen, wurde jedes Plättchen auf diese Weise somit mit $2,94 \times 10^{-5}$ µmol eGFP versehen. Durch das Inkubationsvolumen von 1,5 mL lässt sich der gewählte Bereich der Konzentrationsreihe von $0,37 \times 10^{-5}$ bis $2,94 \times 10^{-5}$ µmol/mL eGFP erklären. Aus dem Verlauf der Konzentrationsreihe kann zusätzlich die Abnahme der Intensität des Fluoreszenzsignals mit fortschreitender Inkubationszeit beobachtet werden, sodass von einer mangelnden Stabilität des eGFPs ausgegangen werden kann. Werden die Fluoreszenzsignale beispielsweise für eine eGFP-Konzentration von $1,47 \times 10^{-5}$ µmol/mL untersucht, kann nach halbstündiger Inkubation ein Wert von 23.000 counts gemessen werden. Im weiteren Verlauf nimmt dieser Wert nach zweistündiger Inkubationszeit auf etwa 8.000 counts ab, bevor nach 24 h mit einem Signal von 2.500 counts praktisch kein Unterschied mehr zur Kontrolle beobachtet werden kann. Bei der Untersuchung der Überstände der inkubierten CS/eGFP/TPP-Beschichtungen zu den drei Zeitpunkten sollte daher der Aktivitätsverlust des eGFPs bedacht werden. Somit können lediglich die erhaltenen Fluoreszenzsignale nach 0,5 und 2 h zur Auswertung herangezogen werden. Aus Abbildung 6—18 kann entnommen werden, dass für alle beschichteten CS/eGFP/TPP-Formulierungen gegenüber der Kontrolle mit 2.600 counts ein erhöhtes Fluoreszenzsignal nach 0,5 h Inkubationszeit beobachtet werden konnte. Das Fluoreszenzsignal ist direkt abhängig vom verwendeten Deacetylierungsgrad, wobei für die CS-83/eGFP/TPP-Beschichtungen ein Wert von etwa 4.000 counts resultiert, während CS-72/eGFP/TPP mit 5.000 counts und CS-58/eGFP/TPP mit 8.000 counts deutlich gesteigert sind. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die vom Deacetylierungsgrad bedingte Instabilität der Materialien zu einer teilweisen Auflösung der Beschichtungen führte. Dadurch findet vermutlich eine Anreicherung des eGFPs im Überstand statt, welche fluorometrisch

detektiert werden konnte. Die bereits in Kapitel 6.1.2 auf Seite 62 dokumentierte Stabilität der CS-83/TPP-Beschichtung verhindert weitgehend ein An- beziehungsweise Ablösen der Nanopartikelschicht, sodass das eGFP weiterhin auf der Substratoberfläche lokalisiert sein sollte und nicht in Lösung gemessen werden kann. Die Betrachtung der Fluoreszenzsignale der Überstände nach 2 h zeigt noch immer den nach 0,5 h beobachteten Trend der CS/eGFP/TPP-Beschichtungen, auch wenn der Unterschied im Rahmen der Fehler nicht mehr statistisch signifikant ist. Grund dafür ist die Abnahme der Fluoreszenzsignale, vor allem für das CS-72/eGFP/TPP- und das CS-58/eGFP/TPP-System, die sich mit der zuvor erwähnten Instabilität des eGFPs erklären lässt. Nach 24 h Inkubationszeit können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fluoreszenzsignalen aus den CS/eGFP/TPP-Beschichtungen beobachtet werden. Für die Berechnung der Einkapselungseffizienzen wurden lediglich die nach 0,5 h erhaltenen Fluoreszenzsignale verwendet, da nur bei diesen Werten eine ausreichende Signifikanz festgestellt werden konnte.

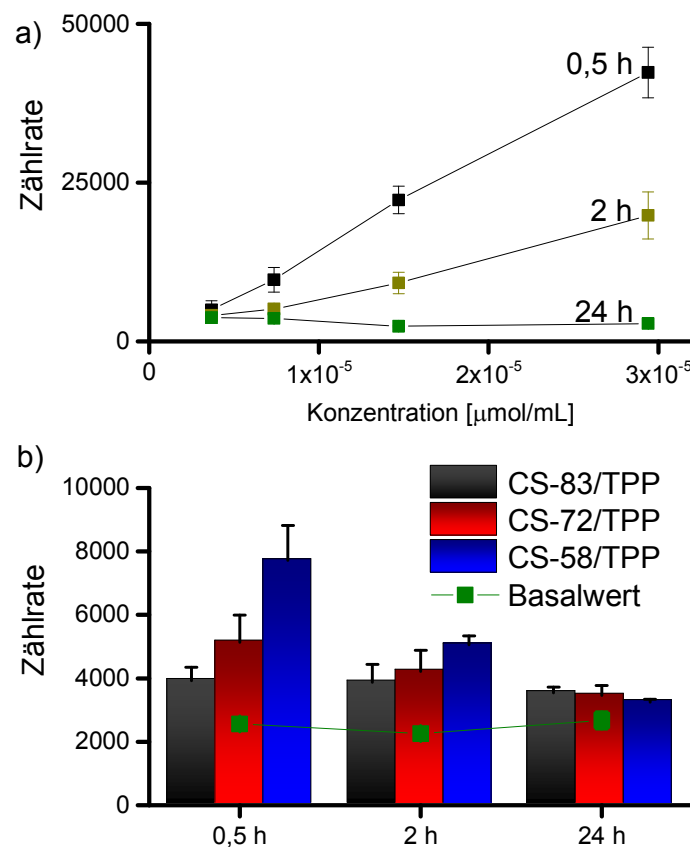


Abbildung 6—18 a) Konzentrationsreihe von eGFP bei verschiedenen Zeitpunkten. b) Fluoreszenzsignale der mit CS/eGFP/TPP-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in Reinstwasser bei 37 °C (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, $2,94 \times 10^{-5}$ μmol eGFP pro Plättchen). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μL . n = 3.

Die erhaltenen Fluoreszenzsignale der CS-58/eGFP/TPP- und CS-72/eGFP/TPP-Beschichtungen nach 0,5 h konnten mithilfe der zuvor aufgenommenen Konzentrationsreihe

entsprechend umgerechnet werden. Dabei wurden für CS-58/eGFP/TPP $5,5 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-6}$ $\mu\text{mol/mL}$ und für CS-72/eGFP/TPP $3,8 \times 10^{-6} \pm 9 \times 10^{-7}$ $\mu\text{mol/mL}$ eGFP erhalten. Werden diese Werte mit der initial beschichteten Menge an eGFP verglichen, so resultieren für CS-58/eGFP/TPP etwa $19 \pm 3 \%$ und für CS-72/eGFP/TPP $13 \pm 3 \%$. Damit konnte gezeigt werden, dass sich zwischen 10 und 20 % eGFP aus den Beschichtungen innerhalb von 0,5 h in Reinstwasser bei 37 °C freisetzen lassen. Die ermittelten Werte korrelieren mit den Ergebnissen der Zentrifugationsexperimente (siehe Abbildung 6—17), bei denen für die CS-83/eGFP/TPP und die CS-72/eGFP/TPP-Formulierungen eine Abnahme des Fluoreszenzsignals von 20 bis 30 % beobachtet werden konnte. Das CS-58/eGFP/TPP-System konnte dabei nicht zur Bestimmung herangezogen werden, da diese Partikel aufgrund des bereits erwähnten Zusammenspiels aus Zetapotential und Dichte nicht sedimentieren. Mithilfe der Beschichtung der Nanopartikelsuspensionen und der anschließenden Inkubation konnte dennoch eine Quantifizierung der eGFP-Einlagerung für das CS-58/TPP-System durchgeführt werden. Angesichts der eGFP-Freisetzung von den CS-58/eGFP/TPP- und CS-72/eGFP/TPP-Beschichtungen scheint eine Übertragbarkeit von den Zentrifugations- auf die Beschichtungsstudien möglich zu sein. Mit den Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass eine unspezifische Freisetzung des eGFPs aus den CS-58/eGFP/TPP- und CS-72/eGFP/TPP-Beschichtungen erfolgt, die mit der Löslichkeit des Chitosans und der damit einhergehenden unzureichenden Stabilität der Gele erklärt werden kann. Durch die Verwendung von CS-83/eGFP/TPP kann diese Freisetzung zwar weitgehend vermieden werden, eine Lysozym-bedingte Degradation wäre dann allerdings nicht mehr möglich.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzmessungen wurden die beschichteten Substrate nach der 24-stündigen Inkubationszeit ellipsometrisch vermessen, um Rückschlüsse über Schichtdickenveränderungen ziehen zu können (Anhang 10-4). Hierbei konnten die bereits in Abbildung 6—7 auf Seite 66 beobachteten signifikanten Schichtdickenabnahmen für das CS-58/eGFP/TPP-System bestätigt werden, während die ausreichende Stabilität der CS-72/eGFP/TPP- und CS-83/eGFP/TPP-Beschichtungen in Reinstwasser erneut nachgewiesen werden konnte. Um CS/TPP-Beschichtungen als Enzym-labiles Drug-Delivery-System zu etablieren, muss letztlich ein Kompromiss zwischen der Degradabilität und der Stabilität gefunden werden. Dabei könnten sich grundsätzlich zwei Optimierungsansätze anbieten, indem entweder das TPP im CS-83/TPP-System gegen einen Enzym-responsiven Crosslinker variiert wird oder die Lysozym-labilen CS-58/TPP-Nanopartikel beispielsweise durch

kovalente Vernetzung stabilisiert werden. Beide möglichen Ansätze wurden im Rahmen dieser Dissertation untersucht und werden in Kapitel 6.2 vorgestellt.

6.1.6 Zelltests^{xxv}

Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz im Körper müssen die betrachteten CS/TPP-Drug-Delivery-Systeme eine ausreichende Biokompatibilität aufweisen. Für die Evaluation der Zellverträglichkeit der Materialien haben sich verschiedene Techniken etabliert, bei denen zwischen der Messung gesunder und geschädigter Zellen unterschieden werden kann. Zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität der Zellen dient unter anderem der Neutralrot-Test, bei dem der Farbstoff nur von gesunden Zellen aufgenommen werden kann. Die Zellviabilität kann auch mittels MTT-Test bestimmt werden, der auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazan beruht.

CellTiterBlue-Assay für die Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CellTiterBlue-Assay durchgeführt, bei dem die Fähigkeit von lebenden Zellen ausgenutzt wird, den Redoxfarbstoff Resazurin in das fluoreszierende Produkt Resorufin umzuwandeln. In den Experimenten wurde eine definierte Anzahl Gingivafibroblasten für 24 h kultiviert, bevor die CS/TPP-Suspensionen (CS-83/TPP; CS-72/TPP und CS-58/TPP) hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit dem CellTiterBlue-Assay hinsichtlich ihrer Vitalität evaluiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6—19 dokumentiert und zeigen sowohl in der Kontrolle (DMEM) als auch in den betrachteten Wirkstoffkonzentrationen der drei CS/TPP-Formulierungen eine nahezu unverändert hohe Zellaktivität. Damit kann festgestellt werden, dass die untersuchten Materialien als Suspension die metabolische Aktivität der Gingivafibroblasten nicht nachteilig beeinflussen. Weiterhin kann im Rahmen dieses Experimentes kein Einfluss des Deacetylierungsgrades des Chitosans konstatiert werden.

^{xxv} Sämtliche Biokompatibilitätsuntersuchungen wurden an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) von Herrn Dr. Andreas Winkel durchgeführt.

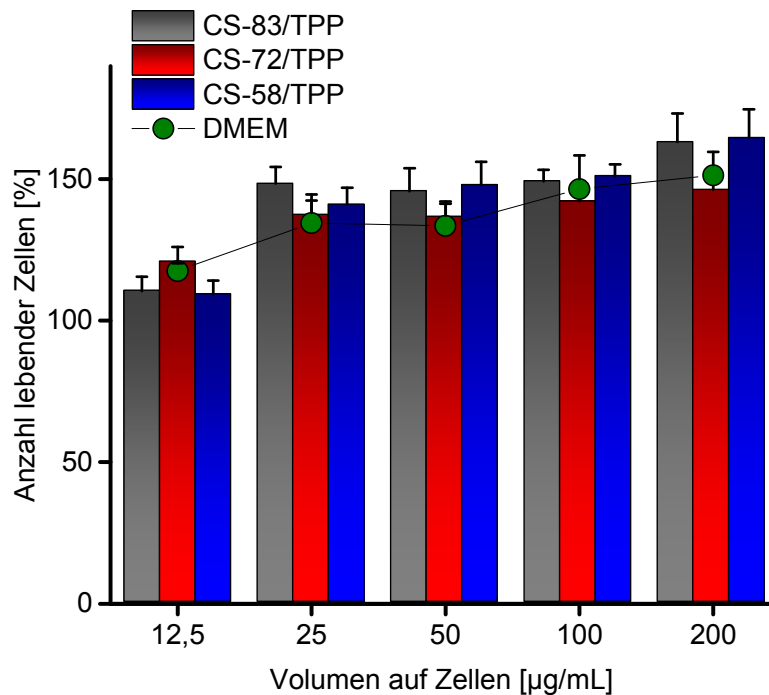


Abbildung 6—19 CellTiterblue-Test der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1).

Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) für die Nanopartikel

Zusätzlich zu dem vorgestellten CellTiterBlue-Test wurde in dieser Arbeit der Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) für die Messung der Membranintegrität verwendet. In unbeschädigten Zellen ist das Enzym LDH in konstanten Konzentrationen im Zytoplasma vorhanden und wird durch intakte Zellmembranen in der Zelle zurückgehalten. Eine Schädigung der Zellmembran, beispielsweise durch Apoptose oder durch eine gezielte Lysierung, führt zu einem Austritt von LDH. Über die Menge an LDH kann letztlich die Anzahl geschädigter Zellen ermittelt werden. Im ersten LDH-Test wurden die Nanopartikelsuspensionen evaluiert, indem nach dem Kultivieren der humanen Gingivafibroblasten unterschiedliche Volumina der CS/TPP-Formulierungen hinzugegeben wurden. Im Anschluss wurde im Überstand die Menge an LDH gemessen und auf die Anzahl geschädigter Zellen zurückgeschlossen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6—20 dargestellt und zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit für alle betrachteten Verdünnungen der CS/TPP-Nanopartikel keinerlei Unterschied zur DMEM-Kontrolle. Die Skalierung der y-Achse, also der Anzahl geschädigter Zellen, bis 20 % wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit gewählt und bekräftigt die geringe Toxizität der untersuchten CS/TPP-Partikelsuspensionen gegenüber humanen Gingivafibroblasten. Dieser Befund kann mit den Ergebnissen des CellTiterBlue-Tests korreliert werden und bestätigt die gute

Zellverträglichkeit der Nanopartikel in dem betrachteten Konzentrationsbereich. Bereits veröffentlichte Biokompatibilitätsuntersuchungen unterstützen zusätzlich die erhaltenen Resultate. SERVAT-MEDINA et al. konnten beispielsweise durch einen MTT-Test von CS-87/TPP-Nanopartikelsuspensionen eine sehr gute Viabilität von humanen embryonalen Hautfibroblasten über einen Zeitraum von 72 h nachweisen.²⁰⁸ In der Veröffentlichung von HUANG et al. wurde darüber hinaus der Deacetylierungsgrad des Chitosans verändert, sodass letztlich die Zellviabilität von CS/TPP-Partikeln mit Deacetylierungsgraden von 46, 61 und 88 bewertet werden konnte. In den Untersuchungen konnten analog zu den hier vorgestellten Experimenten, unabhängig vom Deacetylierungsgrad, keine zelltoxischen Effekte bis 500 µg/mL beobachtet werden.²⁰⁹

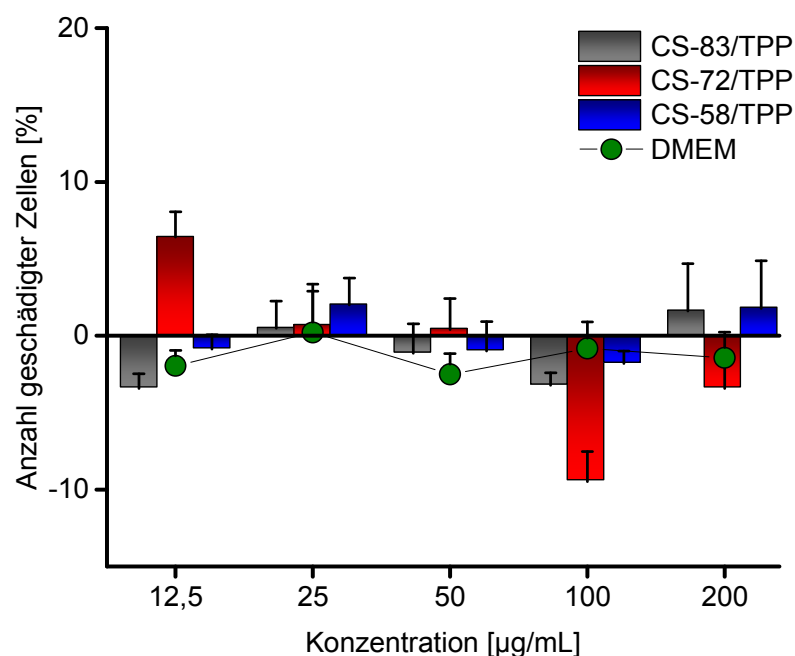


Abbildung 6—20 LDH-Test der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen mit DMEM als Kontrolle (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1).

Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) für die Nanopartikelbeschichtungen

Neben den Biokompatibilitätsuntersuchungen der Nanopartikelsuspensionen wurden die Titanbeschichtungen evaluiert. Dafür wurde ebenfalls ein LDH-Test verwendet, der auf einer Veröffentlichung von TAMADA et al. basiert und an der MHH von HEUER et al. modifiziert wurde.²¹⁰ Hierbei werden die humanen Gingivafibroblasten direkt auf den beschichteten Substraten kultiviert. Durch eine gezielte Lysierung der Zellen nach 24 und 72 h kann die LDH in das umgebende Medium freigesetzt und quantifiziert werden. Daraus lässt sich letztlich die Zahl der Zellen an der Oberfläche bestimmt werden. Der Wert nach 24 h lässt dabei Aussagen über die primäre Adhäsion der humanen Gingivafibroblasten auf der Oberfläche

zu, während sich aus der Quantifizierung nach 72 h Rückschlüsse über die Proliferation ableiten lassen.

Zusätzlich zu den CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Nanopartikelbeschichtungen wurde als Kontrolle bei den Experimenten unbeschichtetes TiAl6V4 untersucht. Die Auswahl der CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen lässt sich auf die Evaluierung der „Extreme“ zurückführen, bei der das hoch deacetylierte und das niedrig deacetylierte Chitosan bewertet werden sollten. Als Beschichtungsmaterial für die gezeigten Versuche diente eine TiAl6V4-Titanlegierung der medizinischen Qualität 5. Der für die TiAl6V4-Legierung erhaltene Wert wurde auf 100 % normiert und alle anderen Ergebnisse dementsprechend angepasst. Der in Abbildung 6–21 dargestellte Zellbewuchs der TiAl6V4-Kontrolle weist sowohl nach 24 als auch nach 72 h einen deutlich höheren Zellbewuchs im Vergleich zu den Nanopartikelbeschichtungen auf. Nach 24 h Inkubationszeit kann bei beiden Nanopartikelbeschichtungen eine deutliche Erniedrigung des Zellbewuchses beobachtet werden, der sich nach 72 h für die CS-83/TPP-Beschichtung bei etwa 20 % manifestiert. Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl die Adhäsion als auch die Proliferation der Zellen deutlich gehemmt ist. Demgegenüber konsolidieren sich die Werte für die CS-58/TPP-Beschichtung nach 72 h bei circa 90 % und sind im Rahmen der statistischen Fehler vergleichbar mit der TiAl6V4-Kontrolle.

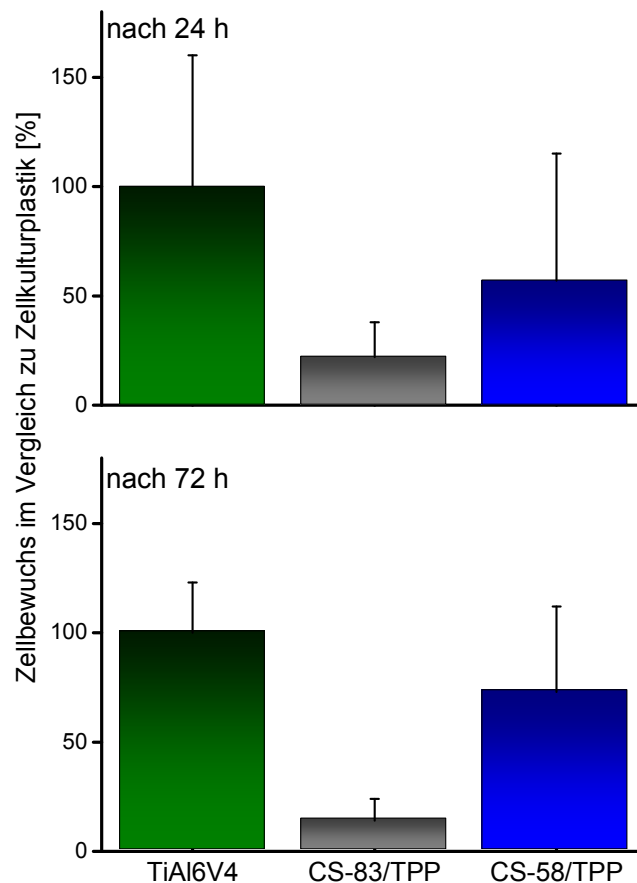


Abbildung 6—21 Ergebnisse des LDH-Tests von humanen Gingivafibroblasten nach 24 und 72 h Inkubationszeit auf CS-83/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen mit unbeschichtetem TiAl6V4-Substrat (medizinische Qualität 5) als Kontrolle (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die CS/TPP-Beschichtungen wurden auf TiAl6V4-Legierung mit einer Beschichtungsdauer von 3 Minuten durchgeführt (entspricht circa 20 μ L). Die ermittelten Werte wurden in Relation zur TiAl6V4-Kontrolle gesetzt, die auf 100 % normiert wurde. n = 3.

Zusätzlich zum LDH-Test wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) von den Oberflächen gemacht, um Aussagen über die Zellmorphologie zu erhalten. Abbildung 6—22 zeigt die nach 24 h erhaltenen REM-Bilder und verdeutlicht hierbei die sehr gute Zellverträglichkeit des unbeschichteten TiAl6V4, da die humanen Gingivafibroblasten einen konfluenten Film auf der Oberfläche ausbilden und eine langgestreckte Morphologie aufweisen. Vergleichbare Zellstrukturen lassen sich auf den CS-58/TPP-Beschichtungen nachweisen. Auf der CS-83/TPP-Beschichtung hingegen können lediglich einzelne sphärische Partikel auf der Oberfläche detektiert werden. Dieser Befund unterstützt damit zusätzlich die Resultate des LDH-Tests (siehe Abbildung 6—21), der einen deutlich schlechteren Zellbewuchs gegenüber der TiAl6V4-Legierung suggerierte. Somit kann festgehalten werden, dass sich die Zellkompatibilität der Beschichtungen vermutlich auf den Deacetylierungsgrad des Chitosans zurückführen lässt, der neben der Ladungsdichte auch die Hydrophilie der Oberfläche beeinflusst. Grundsätzlich wird eine verbesserte Zelladhäsion erwartet, wenn

höher deacetylierte Chitosanderivate verwendet werden. Dieses Verhalten kann mit der Wechselwirkung von positiv geladenen Chitosan mit negativ geladenen Zellen erklärt werden. Diese Interaktion verstärkt sich mit dem Anstieg der positiven Ladungen des Chitosans, also bei höheren Deacetylierungsgraden.^{209,211}

In den gezeigten Untersuchungen wurde ein gegensätzlicher Trend beobachtet, der bei den CS-72/TPP- und den CS-58/TPP-Beschichtungen eine bessere Zelladhäsion als bei der CS-83/TPP-Beschichtung bestätigt. Dieser Sachverhalt lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass eine Protonierung der Chitosanderivate lediglich unter einem pH-Wert von pH 6 zu beobachten ist. Der LDH-Test wird im neutralen Milieu bei pH 7–7,4 durchgeführt, sodass die Protonierung der drei Chitosanderivate nur schwach ausgeprägt ist. Es wird daher vermutet, dass die Hydrophilie der Materialien eine wichtigere Rolle als die Ladungsdichte spielt. Bei dem hoch deacetylierten CS-83 sind 83 % der vergleichsweise hydrophoben N-Acetylgruppen in freie hydrophile Aminogruppen überführt wurden. Nach SMETANA fördert jedoch eine gewisse Hydrophobizität die Adhäsion von Zellen, womit sich die schlechtere Zellanbindung für die hydrophilere CS-83/TPP-Beschichtung erklären lässt.²¹²

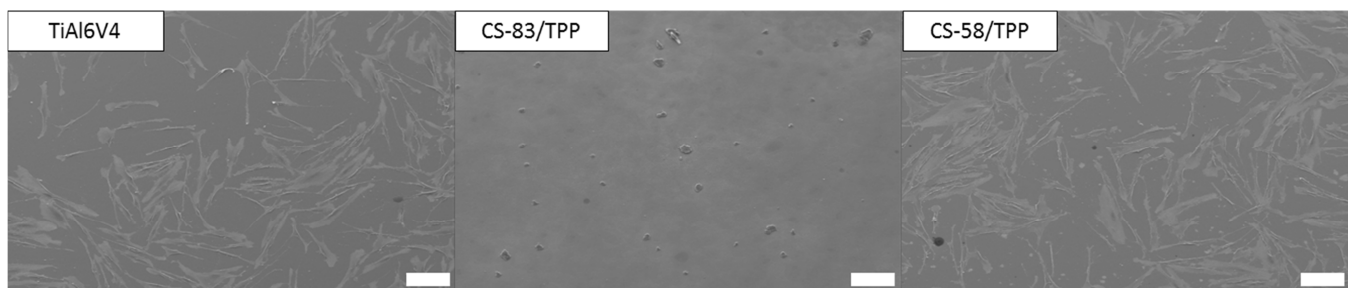


Abbildung 6—22 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem TiAl6V4 und mit CS-83/TPP- und CS-58/TPP-beschichteten TiAl6V4-Legierung nach 24 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Während der Untersuchungen wurde das Substratmaterial für die Beschichtungen, aufgrund der guten Verfügbarkeit, von der anfänglich verwendeten TiAl6V4-Legierung hin zu reinem Titan der medizinischen Qualität 5 gewechselt. Zur Überprüfung wurde der LDH-Test der zellkompatiblen CS-58/TPP-Beschichtung wiederholt und zusammen mit der CS-72/TPP-Beschichtung untersucht. Damit sollte eruiert werden, ob sich die beobachtete ausreichende Zellkompatibilität von CS-58/TPP auch auf das höher deacetylierte CS-72/TPP-System übertragen lässt. Aus Abbildung 6—23 kann zunächst festgestellt werden, dass der Zellbewuchs nach 24 h bei beiden Nanopartikelbeschichtungen bei etwa 70–80 % liegt. Damit lassen sich im Rahmen der Fehler keine signifikanten Unterschiede zur Reintitankontrolle beobachten. Nach 72 h konnten im Vergleich zum Reintitan bei beiden

betrachteten CS/TPP-Beschichtungen Zellzahlen von deutlich über 100 % erhalten werden, die eine sehr gute Zellverträglichkeit suggerieren. Damit konnte die für die CS-58/TPP-Beschichtung in Abbildung 6—21 vermutete gute Zellkompatibilität auch auf Reintitan bestätigt werden. Zudem konnte eine deutliche Abweichung zwischen der zellkompatiblen CS-58/TPP- und der CS-83/TPP-Beschichtung festgestellt werden, die auf den unterschiedlichen Deacetylierungsgrad des Chitosans zurückgeführt wurde. Aus dem guten Zellbewuchs der CS-72/TPP-Beschichtung von 150 % gegenüber dem Reintitan könnte schlussfolgernd vermutet werden, dass sich die Unterschiede in der Zellkompatibilität nur bei sehr hohen Deacetylierungsgraden manifestieren.

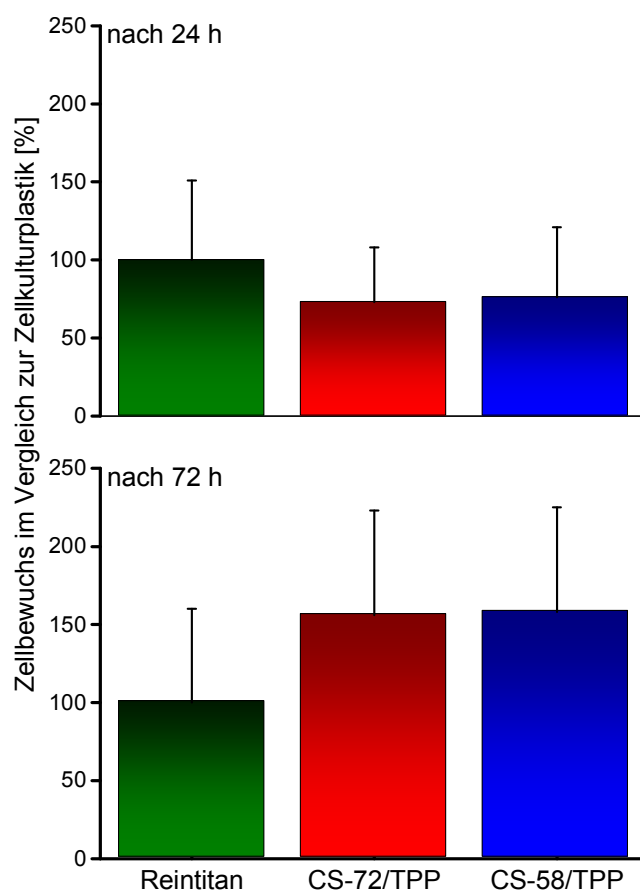


Abbildung 6—23 Ergebnisse des LDH-Tests von humanen Gingivafibroblasten nach 24 und 72 h Inkubationszeit auf CS-72/TPP- und CS-58/TPP-Beschichtungen mit unbeschichtetem Reintitan-Substrat (medizinische Qualität 4) als Kontrolle (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die CS/TPP-Beschichtungen wurden auf Reintitan mit einer Beschichtungsdauer von 3 Minuten durchgeführt (entspricht circa 20 µL). Die ermittelten Werte wurden in Relation zur Reintitan-Kontrolle gesetzt, die auf 100 % normiert wurde. n = 3.

Von den mittels LDH-Tests untersuchten Proben wurden nach 24 und 72 h rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, die in Abbildung 6—24 dargestellt sind. Sowohl auf dem Reintitan als auch auf den mit CS-72/TPP- und mit CS-58/TPP-beschichteten Substraten kann ein konfluenter Zellfilm beobachtet werden. Die Fibroblasten weisen eine

langgestreckte Morphologie auf, was auf eine zellkompatible Oberfläche hinweist. Die REM-Aufnahmen bestätigen damit die aus dem LDH-Test erhaltenen Ergebnisse der untersuchten CS/TPP-Beschichtungen. Es konnte gezeigt werden, dass CS-83/TPP-Beschichtungen keine ausreichende Zelladhäsion von humanen Gingivafibroblasten zulassen, während niedrigere Deacetylierungsgrade zu einer deutlich verbesserten Zellanbindung führen.

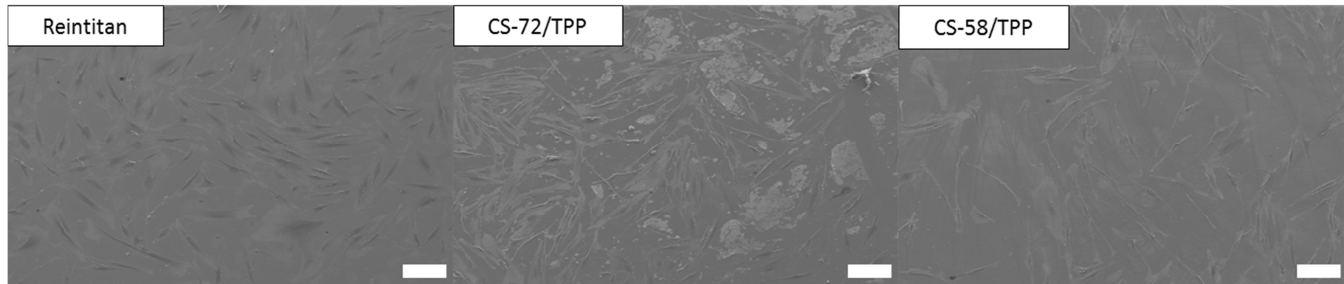


Abbildung 6—24 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem Reintitan und mit CS-72/TPP- und CS-58/TPP-beschichteten Reintitan nach 24 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

6.1.7 Zusammenfassung

Die Charakterisierung der Chitosan/Tripolyphosphat-Nanopartikel mit unterschiedlichen Chitosan-Deacetylierungsgraden (CS-58, CS-72 und CS-83) konnte mithilfe von Dynamischen Lichtstreuexperimenten durchgeführt werden. Die erhaltenen Partikelgrößen konnten zusätzlich mit Kryo-REM bestätigt werden und zeigten keinerlei Abhängigkeit vom DDA des eingesetzten Chitosans. Bei der weiteren Analyse der Partikel zeigte sich hingegen, dass sich das Zetapotential zu größeren positiven Werten verschiebt, wenn sich der DDA des Chitosans erhöht. Diese Beobachtung korreliert mit dem Anteil der freien Aminogruppen im Chitosan, die durch die Verwendung von Essigsäure als Lösungsmittel protoniert werden können. Bei den anschließenden Degradationsstudien in Gegenwart von Lysozym konnte beobachtet werden, dass sich die CS/TPP-Nanopartikel sowohl in Suspension als auch als Beschichtung auf Titan desto schneller abbauen lassen, je niedriger der DDA vom verwendeten Chitosan ist.

Nach der Charakterisierung des Systems wurden die Inkorporation und Freisetzung von IFN β aus dem CS/TPP-System untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass sich das *kommerzielle* IFN β aufgrund seiner Reinheit und seiner hohen Aktivität als Modellwirkstoff eignet. Die Freisetzungsstudien mit immobilisierten CS-58/IFN β /TPP-Nanopartikeln zeigten eine unerwünschte Wirkstofffreisetzung unter Zellkulturbedingungen, die mit einer Reorganisation durch die Anwesenheit multivalenter Ionen erklärt wurde. Demgegenüber

wiesen die CS-58/IFN β /TPP-Beschichtungen in Gegenwart von PBS eine ausreichende Stabilität verbunden mit einer geringen IFN β -Freisetzung auf, die auch durch die Zugabe von Lysozym nicht signifikant gesteigert werden konnte. Zudem wurden Einlagerungsexperimente mit eGFP durchgeführt, bei denen für die CS-72/eGFP/TPP- und die CS-83/eGFP/TPP-Nanopartikelsuspensionen eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals gegenüber freiem eGFP beobachtet werden konnte. Durch das Resuspendieren der Zentrifugationsrückstände konnte etwa 10 % der Fluoreszenz wieder in den Überstand überführt werden. In Inkubationsversuchen bei 37 °C in Reinstwasser konnte aus den CS-58/eGFP/TPP- und den CS-72/eGFP/TPP-Nanopartikelbeschichtungen eine spontane eGFP-Freisetzung von etwa 10-20 % beobachtet werden, die sich mit der partiellen Löslichkeit der Chitosanderivate erklären lässt. Aus den CS-83/TPP-Beschichtungen konnte keine Zunahme des Fluoreszenzsignals festgestellt werden, die auf eine Freisetzung von eGFP schließen lässt.

Zusätzlich wurden die CS/TPP-Nanopartikel auf ihre Zellkompatibilität getestet. Mit zwei verschiedenen Zelltests (CelltiterBlue- und LDH-Assay) konnten für sämtliche betrachteten Nanopartikelsuspensionen (CS-58/TPP; CS-72/TPP und CS-83/TPP) keine zelltoxischen Effekte nachgewiesen werden. Bei der anschließenden Untersuchung der CS/TPP-Beschichtungen auf Titan konnte lediglich für die Formulierung mit dem höchsten DDA (CS-83/TPP) ein signifikanter Rückgang des Zellbewuchses im Vergleich zur Titankontrolle beobachtet werden. Der Unterschied zu den CS-58/TPP- und CS-72/TPP-Beschichtungen könnte mit dem gesteigerten Anteil an Aminogruppen zusammenhängen, welcher durch seine hohe Hydrophilie der Zelladhäsion entgegen wirkt.

6.2 Modifikation des Chitosan-Tripolyphosphat-Systems

Im Vordergrund dieser Dissertation steht die Entwicklung von bioresponsiven Nanomaterialien, die im Falle einer Infektions- oder Inflammationsreaktion den Wirkstoff als Konsequenz einer enzymatischen Degradation freisetzen können. In Kapitel 6.1 konnte bereits die Labilität des CS-58/TPP-Systems in Gegenwart des körpereigenen Enzyms Lysozym, aber auch in physiologisch relevanten Inkubationsmedien, gezeigt werden. Durch die Präsenz in nahezu allen Körperflüssigkeiten kann Lysozym jedoch nicht als Infektionsmarker bezeichnet werden.¹³⁰ Die Einbringung der Nanopartikel in den Körper, ob als Suspension oder als Beschichtung, würde demnach zu einer unspezifischen Degradation führen. Um die Stabilität des CS/TPP-Systems unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten und gleichzeitig eine ausreichende Wirkstofffreisetzung in pathogenen Situationen zu erreichen, wurden verschiedene Konzepte verfolgt, die in den folgenden Unterkapiteln erläutert werden. Hierbei wurde neben click-chemischen Varianten zur Substitution des TPP-Crosslinkers auch Arylazido-funktionalisiertes Chitosan zur Optimierung der Stabilität der Nanopartikel untersucht.

6.2.1 Thiol-En-Clickchemie

Der Einfluss des Deacetylierungsgrads des verwendeten Chitosans auf die Degradabilität der CS/TPP-Nanopartikel in Gegenwart des Enzyms Lysozym wurde bereits ausführlich in Kapitel 6.1 diskutiert. Während die CS-72/TPP- und CS-58/TPP-Formulierungen in dem Zusammenhang als enzymatisch labil eingestuft wurden, wiesen die CS-83/TPP-Nanopartikel eine ausreichende Stabilität unter den betrachteten Konditionen auf. Bedingt durch die Omnipräsenz des Lysozyms unter physiologischen Bedingungen kann eine vorzeitige Degradation der CS-72/TPP- und CS-58/TPP-Nanopartikel nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund steht im Vordergrund dieses Ansatzes die Modifikation des stabilen CS-83/TPP-Systems, um infektionsrelevante Enzyme zu adressieren. Ansatz hierbei ist das Natriumtripolyphosphat (TPP) als Crosslinker durch eine Phosphonat-haltige Aminosäuresequenz zu ersetzen, die spezifisch degradiert werden kann. Dafür ist eine Peptidsequenz so zu gestalten, dass anschließend Phosphonat-haltige Verbindungen gemäß Reaktionsschema 6-2 auf Seite 104 in einer Thiol-En-Reaktion an verfügbare thiolische Aminosäuren wie beispielsweise Cystein gebunden werden können.

Photochemisch initiierte Thiol-En-Clickreaktionen haben sich in den letzten 25 Jahren zu einem bedeutenden Forschungsgebiet innerhalb der organischen Synthese entwickelt.²¹³ Die Kupplung von Thiolen an Olefine verdeutlicht die Vielseitigkeit der Reaktion, die durch hohe Ausbeuten sowie die räumliche und zeitliche Kontrolle unterstützt wird.²¹⁴ Ferner kann die Thiol-En-Clickchemie in Hinblick auf die geringe Konzentration an Nebenprodukten als selektiv bezeichnet werden.²¹⁵

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Thiol-En-Reaktion zunächst an kommerziell erhältlichen aliphatischen Dithiolen als Modell für cysteinhaltige Peptidsequenzen getestet. Dabei wurde gemäß Reaktionsschema 6-2 das Allyldiethylphosphonat **1** in einer photoinitierten Reaktion mit dem jeweiligen Dithiol **2a** oder **2b** zum entsprechenden Thiol-En-Produkt **3a** oder **3b** umgesetzt. Als Photoinitiator wurde 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPAP) verwendet, der im Wellenlängenbereich von 310 – 390 nm UV-Strahlung absorbiert.²¹⁶ Anschließend wurden die Thiol-En-Produkte einem Hydrolyseschritt Reaktionsschema 6-3 auf Seite 104 unterzogen, um die freien Phosphonsäuren **4a** und **4b** zu erhalten. Durch die Dissoziation der Produkte **4a** und **4b** können letztlich die für die ionotrope Gelierung benötigten negativen Ladungen generiert werden.

Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** mit 1,6-Hexandithiol **2a**

In einem ersten Experiment wurde das kommerziell erhältliche 1,6-Hexandithiol **2a** in einer typischen photoinitierten Thiol-En-Reaktion mit Allyldiethylphosphonat **1** umgesetzt, welches zuvor aus Triethylphosphit und Allylbromid nach einer Vorschrift von DAS et al. hergestellt wurde.²¹⁷ Die Reaktionsmischung färbte sich während der Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm von farblos zu gelb, was auf einen Reaktionsumsatz hindeutet. Nach Extraktion und anschließender Flashchromatographie wurden die mono- und die disubstituierten Produkte **5a** und **3a** erhalten (siehe Reaktionsschema 6-4 auf Seite 104).

Die Polarität der Produkte **5a** und **3a** wurde per Dünnschichtchromatographie (DC) evaluiert und mittels DITTMER-LESTER-Reagenz angefärbt, welches sensitiv zur Detektion von Phosphorhaltigen Verbindungen verwendet wird.²¹⁸ Interessanterweise wurden auf der DC-Platte für das monosubstituierte Dithiol **5a** gelbe Spots beobachtet, während für die disubstituierte Verbindung **3a** blaue Spots erhalten wurde. Dieser Unterschied kann höchstwahrscheinlich auf die freie S-H-Bindung des monosubstituierten Produkts **5a** zurückgeführt werden, die eine Reaktion mit dem Färbereagenz eingeht. Insgesamt wurden vier verschiedene

Reaktionsbedingungen untersucht, in denen die molaren Verhältnisse der Edukte variiert wurden, während die Menge des Photoinitiators konstant gehalten wurde. Aus Tabelle 6-1 wird der Einfluss des Verhältnisses der Reaktanten deutlich, da ein Überschuss von Allyldiethylphosphonat **1** gegenüber 1,6-Hexandithiol **2a** die Bildung des disubstituierten Produkts **3a** begünstigt.

Tabelle 6-1 Photo-initiierte Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** (ADEP) mit 1,6-Hexandithiol **2a** (HDT).

Eduktverhältnis (1:2a)	Produktverhältnis (5a:3a)	Ausbeute
0,8	2	70 %
1	1,8	62 %
2	0,9	74 %
4	0,4	68 %

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte durch ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, ^{31}P -NMR- und FTIR-Spektroskopie zusätzlich zu elementaranalytischen und massenspektrometrischen Messungen. Vor allem die in Abbildung 6—25 gezeigten FTIR-Spektren verdeutlichen dabei den Unterschied zwischen den Fraktionen **5a** und **3a**. Die Bande bei 2567 cm^{-1} weist dabei auf die freie Thiolgruppe der monosubstituierten Verbindung **5a** hin.

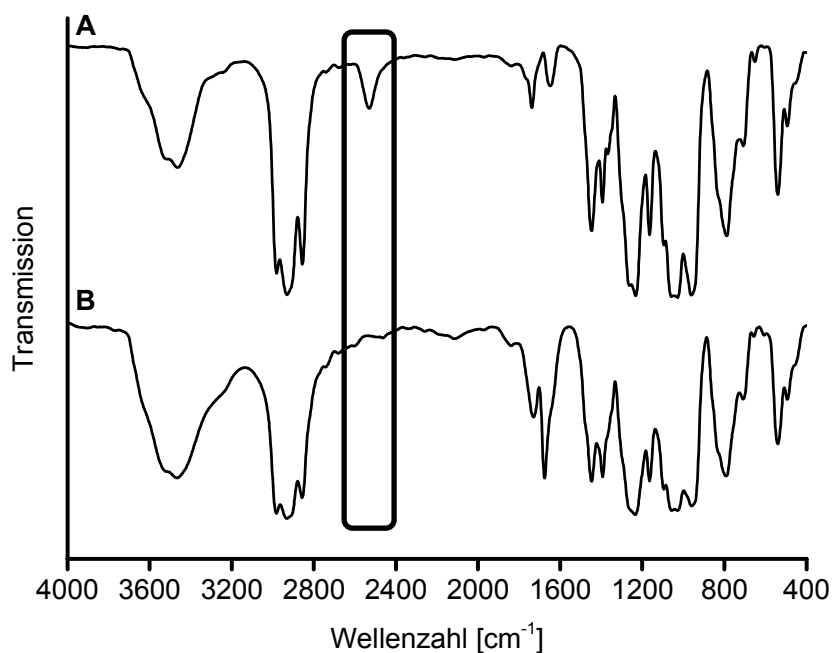


Abbildung 6—25 FTIR-Spektren des monosubstituierten Phosphonatesters **3a** (A) und des disubstituierten Phosphonatesters **5a** (B).

Die isolierten Produkte konnten durch die Verwendung von Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisation (ESI) nachgewiesen werden. Aus den Spektren (siehe Anhang 10-49 und Anhang 10-50) konnte die monosubstituierte Verbindung **5a** (Molekülpeak bei 329 m/z) und das disubstituierte Produkt **3a** (Molekülpeak bei 529 m/z) eindeutig zugeordnet werden. Die disubstituierte Fraktion **3a** wurde danach in einer Hydrolysereaktion in Gegenwart von Trimethylsilylbromid (TMSBr), 2,4,6-Collidin und Natriumhydroxid (NaOH) nach ZHOU et al. eingesetzt, um das Natriumsalz der Phosphonsäure **4a** zu erhalten (siehe Reaktionsschema 6-5 auf Seite 105).²¹⁹

Es konnte ein weißer, wasserlöslicher Feststoff isoliert werden, der mittels ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert und mit dem disubstituierten Phosponatdiethylester **3a** verglichen wurde. Das Verschwinden der von den Estergruppen stammenden Signale bei 4,0 – 4,3 ppm und 1,5 – 1,7 ppm bestätigt die erfolgreiche Hydrolyse zum Natriumsalz der entsprechenden Phosphonsäure **4a** (Abbildung 6—26).

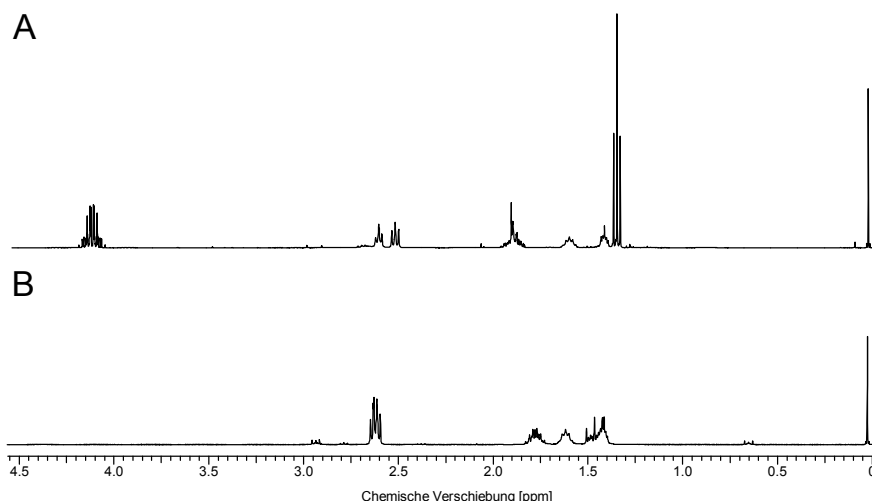


Abbildung 6—26 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des disubstituierten Phosponatesters **3a** (A; in CDCl_3 + TMS) und des Hydrolyseprodukts **4a** (B; in D_2O + DSS).

Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** mit 2,2-Ethylendioxydiethanthiol **2b**

Analog zu Reaktionsschema 6-4 wurde das kommerziell erhältliche 2,2-Ethylendioxydiethanthiol **2b** in der Thiol-En-Reaktion mit dem Allyldiethylphosphonat **1** umgesetzt. Aus dem in Reaktionsschema 6-6 auf Seite 105 gezeigten Reaktionsansatz wurden wiederum zwei Fraktionen isoliert, die als mono- und disubstituierte Produkte **5b** und **3b** identifiziert werden konnten. Die Reaktion wurde mittels extraktiver Methoden aufgearbeitet und die Produkte anschließend per Flashchromatographie getrennt. Durch

regelmäßige Kontrolle mittels DC unter Verwendung des Färbereagens DITTMER-LESTER-Lösung konnte der Reaktionsumsatz verfolgt werden.

Insgesamt wurden die in Tabelle 6-2 zusammengefassten Reaktionsbedingungen untersucht, in denen das molare Verhältnis der Edukte variiert wurde, während die Initiatorkonzentration von DMAP unverändert blieb. Übereinstimmend mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen für 1,6-Hexandithiol **2a** und dem Allylphosphonat **1** (siehe Tabelle 6-1) kann durch eine Erhöhung des molaren Verhältnisses des Phosphonats gegenüber dem Dithiol eine höhere Ausbeute des disubstituierten Produkts **3b** erhalten werden.

Tabelle 6-2 Photo-initiierte Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** (ADEP) mit 2,2-Ethylendioxydiethanthiol **2b** (EDDT).

Eduktverhältnis (1:2b)	Produktverhältnis (5b:3b)	Ausbeute
0,8	2,1	94 %
1	1,9	74 %
2	1,8	94 %
4	0,6	95 %

Übereinstimmend mit den vorherigen Untersuchungen wurden die beiden Fraktionen durch ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, ^{31}P -NMR- und FTIR-Spektroskopie und elementaranalytische Untersuchungen charakterisiert. Aus dem FTIR-Spektrum kann die Anwesenheit des Thiolsignals der monosubstituierten Verbindung **5b** bei 2567 cm^{-1} beobachtet werden, sodass der strukturelle Unterschied der Fraktionen verifiziert werden konnte (Abbildung 6—27).

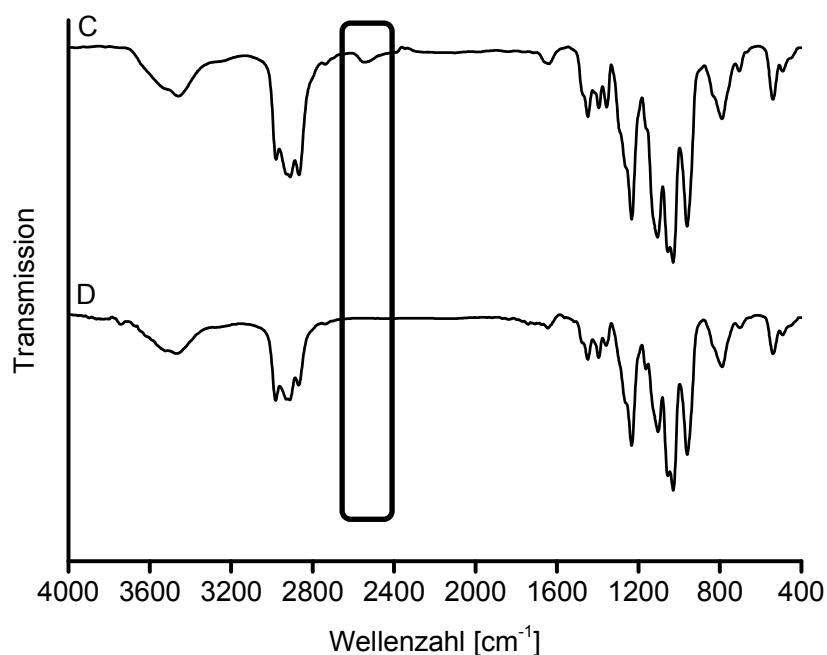


Abbildung 6—27 FTIR-Spektren des monosubstituierten Phosphonatesters **5b** (C) und des disubstituierten Phosphonatesters **3b** (D).

Die Charakterisierung der isolierten Verbindungen durch ESI-MS (siehe Anhang 10-51 und Anhang 10-52) lieferte das monosubstituierte Produkt **5b** (Molekülpeak bei 383 m/z) und den disubstituierten Phosphonatester **3b** (Molekülpeak bei 561 m/z), der nach ZHOU et al. zum Natriumsalz der korrespondierenden Phosphonsäure **4b** hydrolysiert wurde.²¹⁹ Die in Reaktionsschema 6-7 auf Seite 105 dargestellte Reaktion lieferte das gewünschte Produkt als leicht gelblichen, wasserlöslichen Feststoff.

Aus dem aufgenommenen ¹H-NMR-Spektrum in Abbildung 6—28 kann der Hydrolyseschritt des Edukts **3b** zum Produkt **4b** bestätigt werden. Während die Signale bei 4,0 – 4,3 ppm und 1,2 – 1,4 ppm für die Anwesenheit der Diethylestergruppe verantwortlich zeichnen, kann das Verschwinden der Signale als Hinweis auf eine erfolgreiche Hydrolyse gedeutet werden.

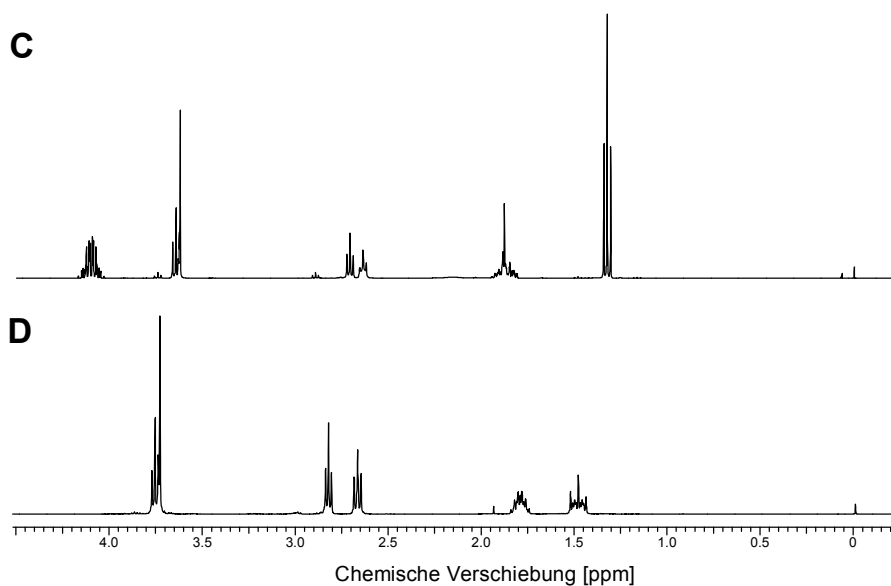


Abbildung 6—28 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren des Phosphonatesters **3b** (C; in CDCl_3 + TMS) und des Hydrolyseprodukts **4b** (D; in D_2O + DSS).

Die Verbindungen **4a** und **4b** wurden im Anschluss in 0,1 %-iger AcOH gelöst und für die Nanopartikelbildung mit CS-83 getestet (siehe Kapitel 0)

Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** mit Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**

Mithilfe der Expertise der Thiol-En-Chemie des Allyldiethylphosphonats **1** mit den dithiolischen Verbindungen **2a** und **2b** wurde in der Folge das in Abbildung 6—29 dargestellte komplexere Tetrathiol **6** in der Reaktion eingesetzt.

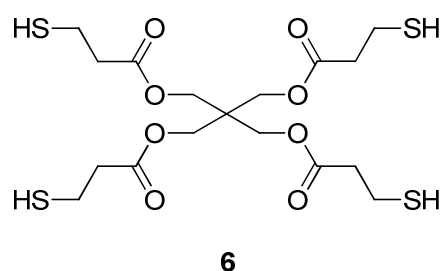


Abbildung 6—29 Strukturformel von Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**.

Die Reaktion wurde analog der bekannten Vorgehensweise mit DMAP als Photoinitiator unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm durchgeführt. Nach Extraktion und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung des Reaktionsgemisches konnten insgesamt fünf Fraktionen isoliert werden, von denen vier Verbindungen durch ^1H -NMR-Spektroskopie eindeutig dem mono-, di-, tri- und tetrasubstituiertem Tetrathiol zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 6—30).

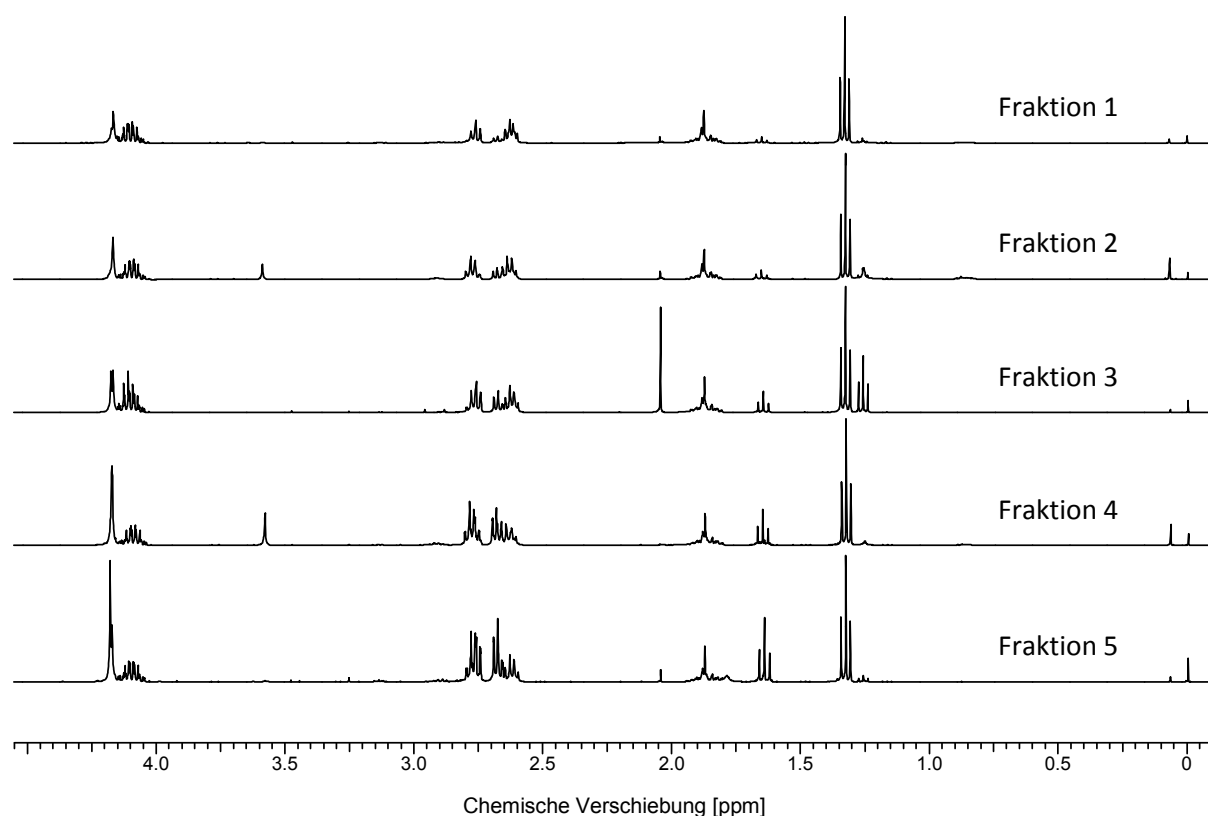


Abbildung 6—30 ^1H -NMR-Spektren der fünf isolierten Verbindungen aus der Thiol-En-Reaktion des Allyldiethylphosphonats **1** mit Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**.

Aus Abbildung 6—30 kann entnommen werden, dass sich die Integrale der Ethylestergruppen (1,6 ppm und 4,1 – 4,2 ppm) von Fraktion 1 bis Fraktion 5 erhöhen, was auf eine vermehrte Anzahl an substituierten Thiolgruppen hinweist. Fraktion 1 konnte als monosubstituierte Verbindung **7** charakterisiert werden, während die Fraktionen 3, 4 und 5 den entsprechenden Verbindungen **8**, **9** und **10** zugeordnet werden können. Die Identität von Fraktion 2 konnte nicht vollständig geklärt werden, könnte aber laut ^1H -NMR-Spektrum am ehesten als Mischfraktion von **7** und **8** gedeutet werden.

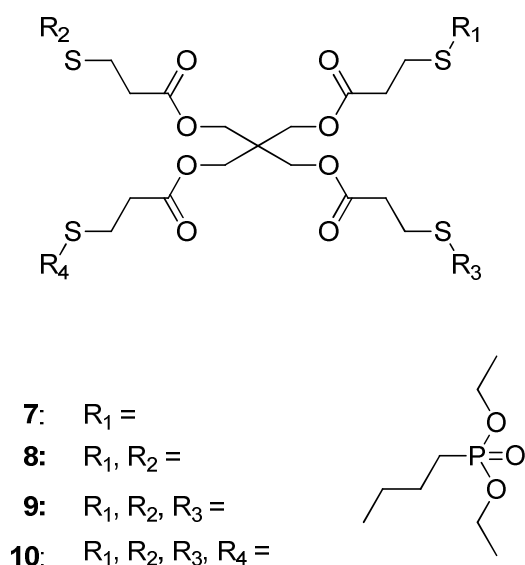


Abbildung 6—31 Strukturformeln der isolierten Produkte aus der UV-initiierten Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** und Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**.

Die Ergebnisse der Thiol-En-Kupplung, d.h. Ausbeuten, R_f -Werte und die molaren Verhältnisse der Produkte, sind im Detail in Tabelle 6-3 zusammengefasst. Bei der Reaktion wurde ein molares Verhältnis der Edukte von 0,8 : 1 (Allyldiethylphosphonat **1** : Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**) gewählt. Durch den Einsatz des Tetrathiols im Überschuss, kann die hohe Ausbeute an monosubstituiertem Produkt **7** (Fraktion 1) erklärt werden, während die anderen Fraktionen dementsprechend weniger wahrscheinlich gebildet werden. Das gewünschte tetrasubstituierte Produkt **10** entsteht bei den betrachteten Reaktionsbedingungen nur zu 2 %, sodass durch eine Variation der molaren Eduktverhältnisse die Produktbildung beeinflusst werden könnte. Anhand der R_f -Werte kann eindeutig abgeleitet werden, dass die einzelnen Fraktionen durch eine Erhöhung der Anzahl der Ethylestergruppen polarer werden.

Tabelle 6-3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der UV-initiierten Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** und Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**.

Fraktion	R_f -Wert	Ausbeute	Verhältnis	Zuordnung
1	0,54 ^{a)}	37 %	18,5	mono
2	0,38 ^{a)}	-	-	-
3	0,19 ^{a)}	15 %	7,5	di
4	0,1 ^{a)}	4 %	1	tri
5	0,05 ^{b)}	2 %	2	tetra

EtOAc:MeOH 95:5; b) EtOAc:MeOH 80:20

Zusätzlich zu der Charakterisierung der isolierten Produkte durch ^1H -NMR-, ^{13}C NMR- und ^{31}P NMR-Spektroskopie wurden elementaranalytische und IR-Messungen durchgeführt. Die in Abbildung 6—32 gezeigten IR-Spektren der isolierten Fraktionen bestätigen die ^1H -NMR-Ergebnisse, da die Thiol-spezifische Bande bei 2567 cm^{-1} in den höhersubstituierten Fraktionen sukzessive verschwindet.

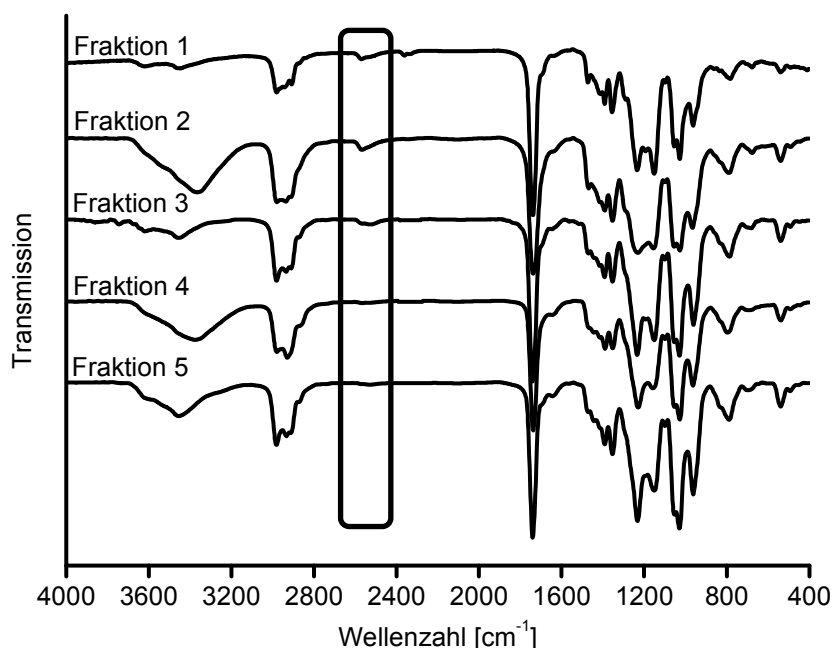
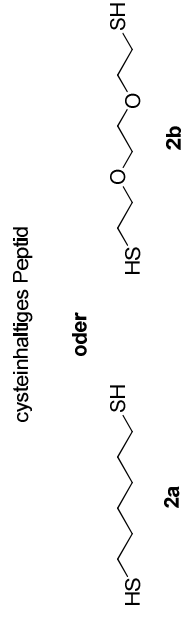
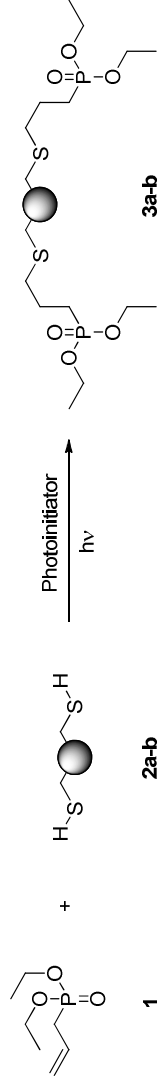


Abbildung 6—32 IR-Spektren der isolierten Produkte aus der UV-initiierten Thiol-En-Reaktion von Allyldiethylphosphonat **1** und Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**.

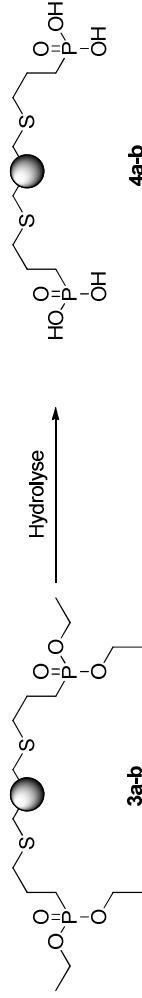
Das erhaltene tetrasubstituierte Produkt **10** wurde analog der Standardvorschrift in einer Hydrolysereaktion mit TMSBr, 2,4,6-Collidin und NaOH eingesetzt, um das entsprechende Natrium Salz zu generieren (siehe Reaktionsschema 6-8 auf Seite 106). Die Isolierung des Hydrolyseprodukts **11** konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, weil die Substanz bei der Aufreinigung nicht als Feststoff präzipitierte. In der erhaltenen Lösung konnte das Produkt **11** nicht nachgewiesen werden. Daher konnte die Nanopartikelbildung zusammen mit Chitosan nicht untersucht werden.

Übersicht der Reaktionen aus Kapitel 6.2.1



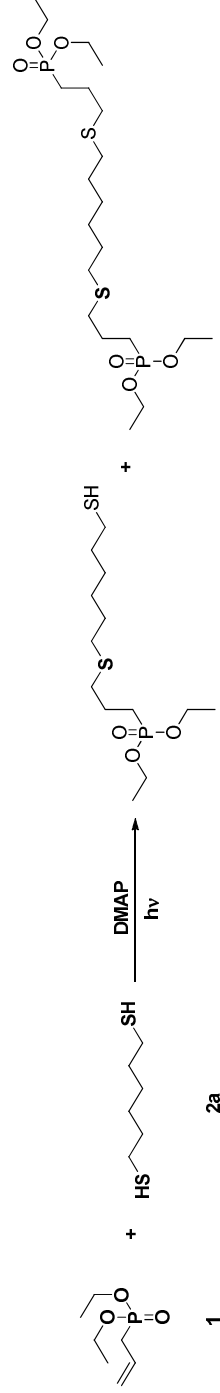
Reaktionsschema 6-2

Mögliche Thiol-En-Reaktionen des Allyldiethylphosphonats **1** mit dithiolischen Verbindungen (Cystein-haltiges Peptid, **2a** oder **2b**) zum jeweiligen Kupplungsprodukt.



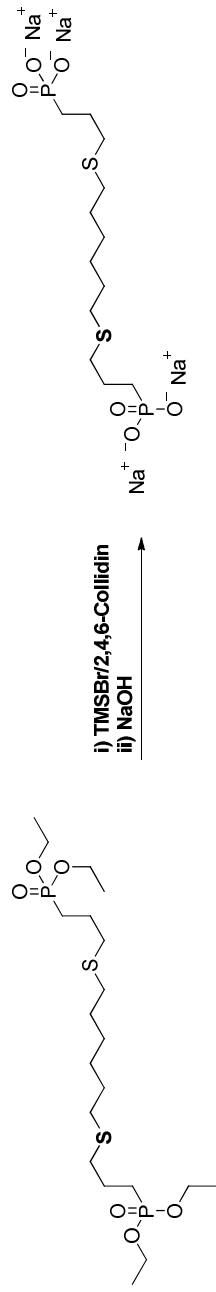
Reaktionsschema 6-3

Hydrolysereaktion der Thiol-En-Produkte **3a** oder **3b** zu den entsprechenden freien Phosphonsäuren **4a** und **4b**.

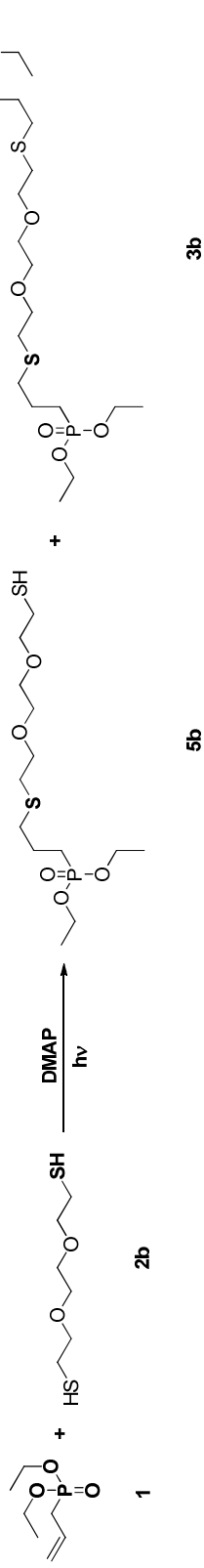


Reaktionsschema 6-4

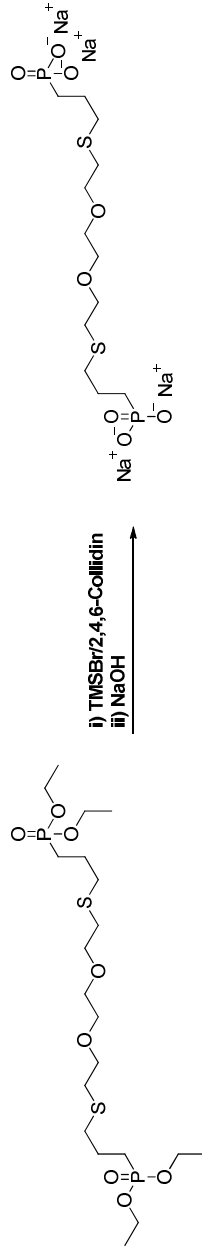
Thiol-En-Reaktion des Allyldiethylphosphonats **1** mit 1,6-Hexandithiol **2a** zu den mono- und disubstituierten Fraktionen **5a** und **3a**



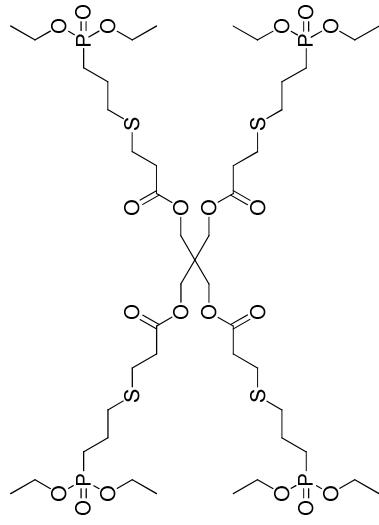
Reaktionsschema 6-5 **3a** Hydrolyse des disubstituierten Phosphonates **3a** zum Natriumsalz der entsprechenden Phosphonsäure **4a**.



Reaktionsschema 6-6 Thiol-En-Reaktion des Allyldiethylphosphonats **1** mit 2,2-Ethylendioxydiethanthiol **2b** zu den mono- und disubstituierten Fraktionen **5b** und **3b**.

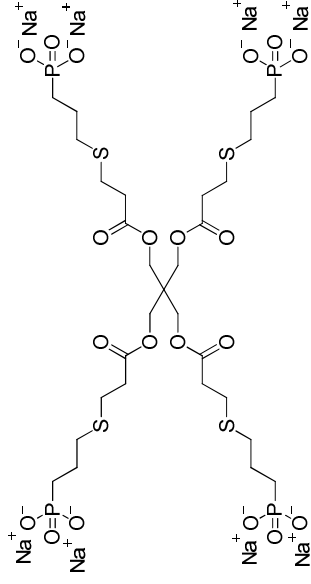


Reaktionsschema 6-7 **3b** Hydrolyse des disubstituierten Phosphonates **3b** zum Natriumsalz der entsprechenden Phosphonsäure **4b**.



10

i) TMSBr/2,4,6-Collidin
ii) NaOH



11

Reaktionsschema 6-8

Hydrolyse des tetrasubstituierten Phosphonatesters **10** zum Natriumsalz der entsprechenden Phosphonsäure **11**.

6.2.2 Verwendung als TPP-Ersatz

Die isolierten Hydrolyseprodukte **4a** und **4b** wurden in der Folge als Alternative zu Natriumtripolyphosphat in der Nanopartikelherstellung mit dem Modellpolymer CS-83 eingesetzt. Phosphonsäuren sind zweiprotonige Säuren, die einen pK_{a1} von etwa 1 bis 2 und einen pK_{a2} von 6 bis 8 besitzen.²²⁰ Anhand der pK_a -Werte von Phosphonsäuren sollten die synthetisierten Produkte **4a** und **4b** in 0,1 %-iger AcOH daher teilweise dissoziiert vorliegen und eine negative Ladung aufweisen, die sie zu einer Nanopartikelbildung befähigen sollten. Nichtsdestotrotz konnte die Herstellung der Nanopartikel aus CS-83 in Kombination mit den Verbindungen **4a** und **4b** nicht erfolgreich durchgeführt werden. Daher wurde eine Rechnung angestellt, um das herkömmliche CS-83/TPP-System mit den CS-83/**4a**- und CS-83/**4b**-Formulierungen vergleichen zu können.

Wenn eine Chitosan/TPP-Formulierung (3:1 in 0,1 % AcOH, beide 1 mg/ mL) verwendet wird, kann man für die Glucosamineinheiten des Chitosans bei einer Gesamtsuspension von 1 mL unter Betrachtung des mittleren Molekulargewichts einer Glucosamineinheit abschätzen:

$$\text{Glucosamin} \equiv \text{positive Ladung} = \frac{0,75 \text{ mg}}{168.340 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 4,46 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 0,83 = 3,70 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Und für das Natriumtripolyphosphat:

$$\text{TPP} \equiv \text{negative Ladung} = \frac{0,25 \text{ mg}}{367.860 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 6,80 \times 10^{-7} \text{ mol} \times 4 = 2,72 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Demzufolge sind die Ladungsverhältnisse trotz des Volumenverhältnisses von 3:1 von Chitosan zu TPP ungefähr ausgeglichen. Werden jetzt die hydrolysierten Verbindungen **4a** und **4b** betrachtet, so fällt auf, dass weniger negative Ladungen als beim TPP zugegeben werden.

$$\mathbf{4a} \equiv \text{negative Ladung} = \frac{0,25 \text{ mg}}{482.625 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 5,18 \times 10^{-7} \text{ mol} \times 4 = 2,07 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

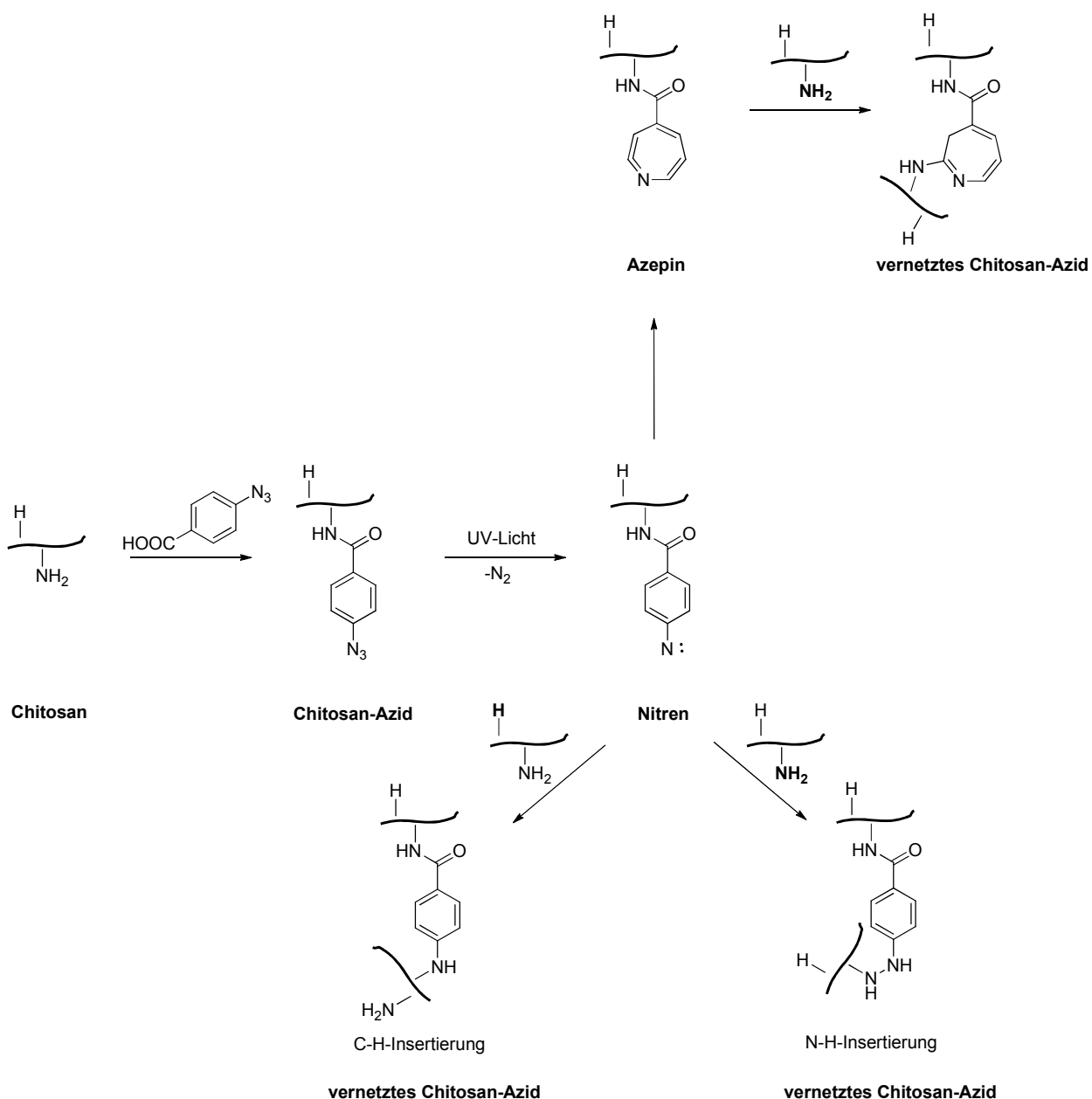
$$\mathbf{4b} \equiv \text{negative Ladung} = \frac{0,25 \text{ mg}}{514.403 \frac{\text{mg}}{\text{mol}}} = 4,86 \times 10^{-7} \text{ mol} \times 4 = 1,94 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Prinzipiell sollten sich trotz der verminderten Ladung der synthetisierten Natriumsalze **4a** und **4b** Nanopartikel bilden lassen. Zusätzlich wurden neben dem herkömmlichen

Standardprotokoll mit einem Mischungsverhältnis von 3:1 (CS-83 zu **4a** oder **4b**) auch andere Verhältnisse ausprobiert, welche jedoch auch nicht zur Nanopartikelbildung führten. Somit konnten die hergestellten Hydrolyseprodukte nicht weitergehend als Alternative für TPP untersucht werden. Aufgrund dieser negativen Resultate aus diesen Vorexperimenten wurde in der Folge nicht versucht, Peptidsequenzen mit Phosphonsäuregruppen zu versehen.

6.2.3 Chitosanazid-Tripolyphosphat-Nanopartikel

Die in Kapitel 6.1.4 vorgestellten Freisetzungsuntersuchungen von Interferon- β (IFN β) in den CS/TPP-Nanopartikeln zeigen eine vorzeitige Freisetzung des Wirkstoffs in den betrachteten Medien. Um das System stabiler zu gestalten und die Leckage zu reduzieren, wurde ein Ansatz untersucht, bei dem die Materialien durch UV-Bestrahlung vernetzt werden. Entsprechende photovernetzbare Chitosanderivate mit Arylazidogruppen wurden ausgehend von hochdeacetyliertem Chitosan (CS-83) bereits von HADLER synthetisiert und deren Anbindung auf Polyimidfolien untersucht.²²¹ Die Einführung von photochemisch aktiven Gruppen wie beispielsweise Arylazido-^{222–224} oder Benzophenongruppen²²⁵ in Polysaccharide und deren anschließende UV-initiierte Vernetzung wurde bereits ausführlich beschrieben. Arylazido-modifiziertes Chitosan (CSAazid) kann durch Amidkupplung zwischen dem freien Amin des Chitosans und der Carboxylgruppe der 4-Azdiobenzoessäure erhalten werden. Im nachstehenden Reaktionsschema 6-9 ist der mögliche Mechanismus der Photovernetzung der Arylazidogruppe illustriert. Bei der Vernetzungsreaktion erfolgt eine photolytische Spaltung der Azidogruppe unter Stickstofffreisetzung zu einem hochreaktiven Nitren, welches durch Ringexpansion zu einem Azepin aufgeweitet werden kann.²²² Anschließend kann das Azepin mit nukleophilen Gruppen in direkter Nachbarschaft reagieren und so zu einer Vernetzung führen.²²² Neben der Ringexpansion können Nitrene auch in Kohlenstoff-Wasserstoff- und in Stickstoff-Wasserstoff-Bindungen insertieren und auf diese Weise eine Vernetzung einleiten.²²⁶

**Reaktionsschema 6-9**

Mögliche Reaktionsschritte der Photovernetzung von Arylazidgruppen mit Chitosan.

Die eigentliche Einführung der Arylazidgruppen erfolgt durch eine Amidkupplung, indem gemäß Ono et al. 4-Azidobenzoessäure unter Verwendung der Reagenzien *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) kovalent an die freien Aminogruppen der β -D-Glucosamin-Einheiten des Chitosans gebunden werden.²²³ Mit dieser Methode konnten allerdings lediglich 2,5 % aller Aminogruppen erfolgreich modifiziert werden.²²³ Von HADLER wurde die Amidkupplung von 4-Azidobenzoessäure an CS-83 optimiert, indem 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (DMT-MM) als Kupplungsreagenz verwendet wurde. Dadurch

war es möglich CS-83 mit einem linear einstellbaren Modifikationsgrad zwischen 7 % und 20 % mit der Arylazidofunktionalität zu versehen.²²¹

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf enzymatisch degradablen Nanomaterialien, sodass eine Modifikation des Lysozym-labilen CS-58 (siehe Abbildung 6—7 auf Seite 66) angestrebt wird. Dadurch sollen kovalent vernetzte Nanopartikel generiert werden, bei denen durch die Einstellung des Arylazido-Substitutionsgrades die Wirkstofffreisetzung gesteuert werden kann. Die UV-initiierte Kupplung erfolgte nach dem von HADLER entwickelten Standardprotokoll, indem das niedrig deacetylierte CS-58 in einer wässrigen HCl-Lösung unter Verwendung von DMT-MM mit der Arylazidogruppe versehen wurde.²²¹ Insgesamt wurden drei Ansätze mit unterschiedlichen Substitutionsgraden (10 %, 20 % und 30 %) durchgeführt, die nach der Reaktion dialysiert (gegen NaCl-Lösung und Wasser) und lyophilisiert wurden. Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgte durch die Auswertung der von den Arylazidogruppen stammenden Integrale bei 7,7 und 7,2 ppm im ¹H-NMR-Spektrum (siehe Anhang 10-36 – Anhang 10-38). Die in Tabelle 6-4 zusammengefassten Ergebnisse der Versuche zeigen eine große Diskrepanz zwischen dem theoretischen und dem experimentell erhaltenen Substitutionsgrad (DS). Nichtsdestotrotz konnte eine Abhängigkeit des DS des Chitosanderivates mit steigendem Gehalt an 4-Azidobenzoesäure und DMT-MM beobachtet werden.

Tabelle 6-4 Zusammenfassung des theoretischen und per ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelten Substitutionsgrades (DS) von drei verschiedenen Ansätzen zur UV-initiierten Amidkupplung von 4-Azidobenzoesäure mit CS-58 unter Verwendung von DMT-MM.

Probe	Theoretischer DS	Experimenteller DS
CSAzid-10	10 %	0,8 %
CSAzid-20	20 %	3 %
CSAzid-30	30 %	6 %

Die synthetisierten Derivate wurden anschließend mit einer Konzentration von 1 mg/mL in 0,1 % Essigsäure gelöst. Die Partikelbildung wurde untersucht, indem zunächst dieselben Verhältnisse wie beim unmodifizierten CS-58 verwendet wurden (3:1). Die Partikelgrößenverteilungen der drei Ansätze vor und nach der Belichtung (in Quarzglasküvette angesetzt, 100 mW/cm², 3 min, 290 nm Filter) sind in Abbildung 6—33 gezeigt. Es konnten auf diese Weise Nanopartikel im Bereich von 130 – 180 nm mit geringen Polydispersitäten von 0,25 – 0,3 präpariert werden. Nach der Belichtung verschieben sich die

Hauptmaxima der Kurven leicht, ein allgemeingültiger Trend kann jedoch nicht festgestellt werden. Auf diese Weise verändern sich beispielsweise die mittleren Partikelgrößen von CSAzid-10/TPP insignifikant von 165 nm auf 150 nm, während bei CSAzid-20/TPP eine leichte Zunahme von 152 nm auf 171 nm beobachtet werden konnte. Die CSAzid-30/TPP-Nanopartikel, deren Partikelgrößen etwa gleichbleibend bei 145 nm liegen, zeigen den geringsten Einfluss der UV-Belichtung. Zusammenfassend lässt sich somit keine signifikante Änderung der Partikelgröße infolge der UV-Belichtung für diese drei Formulierungen beobachten.

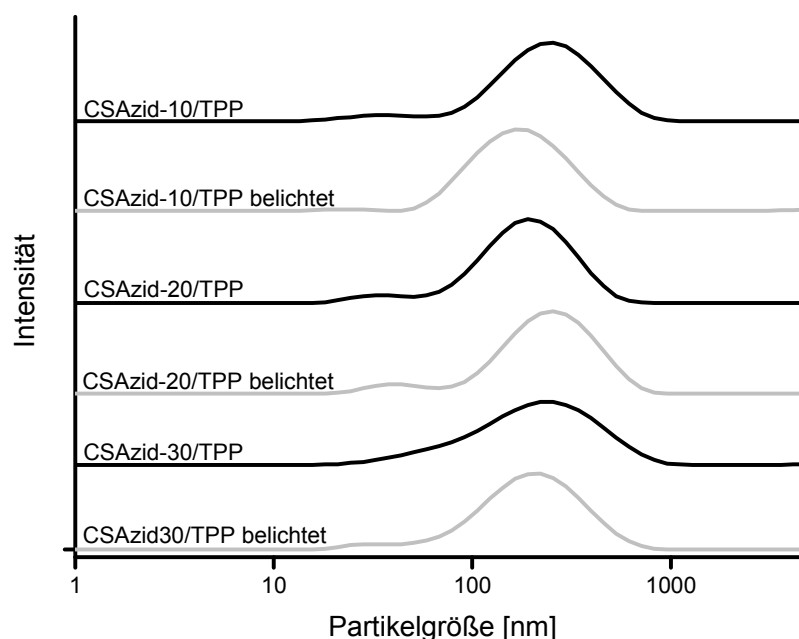


Abbildung 6—33 Vergleich der Partikelgrößenverteilungen für die drei CSAzid/TPP-Formulierungen vor und nach der Belichtung bei 290 nm (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1).

Anschließend wurden für die drei Ansätze Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Die erhaltenen Partikelgrößen in Abhängigkeit von der Zeit sind in Abbildung 6—34 aufgetragen. Die in Abbildung 6—33 untersuchten Partikel wurden nach der Belichtung zunächst für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert und per Dynamischer Lichtstreuung vermessen, bevor 1,5 µg/mL Lysozym hinzugefügt wurde. Während diesem ersten Inkubationsschritt konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Temperatur generell keinen Einfluss auf die Partikelgröße besitzt. Die geringe Diskrepanz des ersten Messwertes bei 0 h lässt sich auf die Trägheit des Systems zurückführen, welches von 20 °C auf 37 °C erwärmt werden musste. Nach 4-stündiger Inkubation ohne Lysozym wurde bei jeder Probe 1,5 µg/mL Lysozym hinzugefügt. Bei allen drei Systemen manifestiert sich die Zugabe des Enzyms in einer deutlichen Abnahme der Partikelgrößen. Diese Enzym-initiierte Degradation wurde über einen

Gesamtzeitraum von etwa 24 h verfolgt, wobei die initiale Partikelgröße dabei bei jedem CSAzid/TPP-System um etwa 30 nm verringert wurde. Dieser Befund zeigt, dass die CSAzid/TPP-Partikel unabhängig vom DS des Chitosans weiterhin durch Lysozym abbaubar sind, sodass eine getriggerte Freisetzung möglich ist. Die Spaltung des Chitosanrückgrats durch Lysozym zieht eine Auflösung des Netzwerks nach sich. Hierbei könnte die Verwendung von niedrig konzentrierten Partikelsuspensionen (jeweils 1 mg/mL) eine entscheidende Rolle spielen, indem sich eventuell zu wenige Reaktionspartner in der Lösung befinden, die miteinander eine Vernetzung eingehen können. Da die Dynamischen Lichtstreuemessungen keine Unterscheidung zwischen unvernetzten und vernetzten Partikeln zulassen, müssten die Proben vor und nach der UV-Behandlung zusätzlich durch Kryo-REM-Untersuchungen charakterisiert werden. Auf diese Weise könnte festgestellt werden, ob die Partikelsuspensionen durch Belichtung beeinflusst werden.

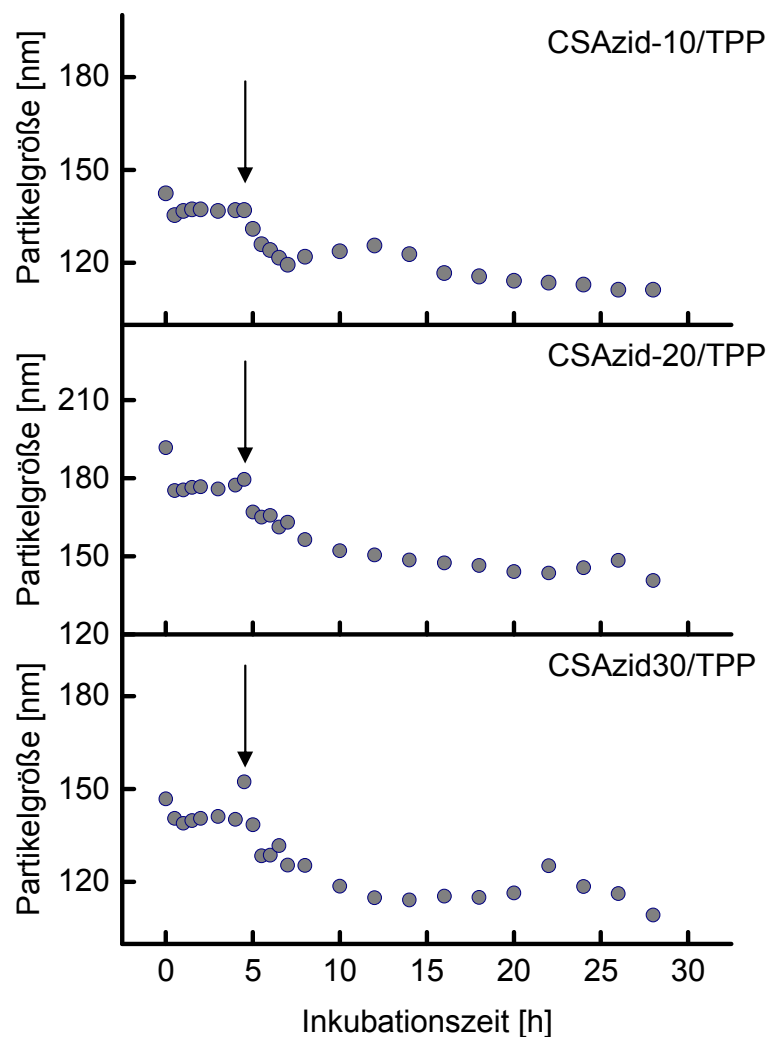


Abbildung 6—34 Partikelgrößenverlauf der drei CSAzid/TPP-Formulierungen nach Inkubation bei 37 °C bis vier Stunden und bei anschließender Zugabe von 1,5 µg/mL Lysozym (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Der durch den Pfeil markierte Bereich bei 4 h kennzeichnet jeweils die Zugabe der Lysozymlösung.

Zusätzlich wurden die CSAzid/TPP-Nanopartikel als Beschichtung auf Titansubstraten untersucht. Dafür wurden die unvernetzten Partikel auf polierte Titanplättchen gesprüht und per Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS) untersucht. Anschließend wurden die Substrate mit UV-Licht der Wellenlänge 290 nm belichtet und wiederum per RAIRS vermessen. Hierbei muss beachtet werden, dass die erhaltenen Intensitäten bei dieser Methode sehr niedrig sind und die relevanten Banden im Spektrum nur schwer zu erkennen sind. In den IR-Spektren vor der Belichtung lassen sich vor allem bei den CSAziden/TPP-Formulierungen mit Substitutionsgraden von 20 % und 30 % Azidpeaks bei 2137 cm^{-1} detektieren, welche nach der Belichtung nicht mehr nachgewiesen werden können. Dieser Befund spricht dafür, dass die Azide auf der Titanoberfläche infolge der Bestrahlung mit UV-Licht eine Vernetzungsreaktion eingegangen sind.

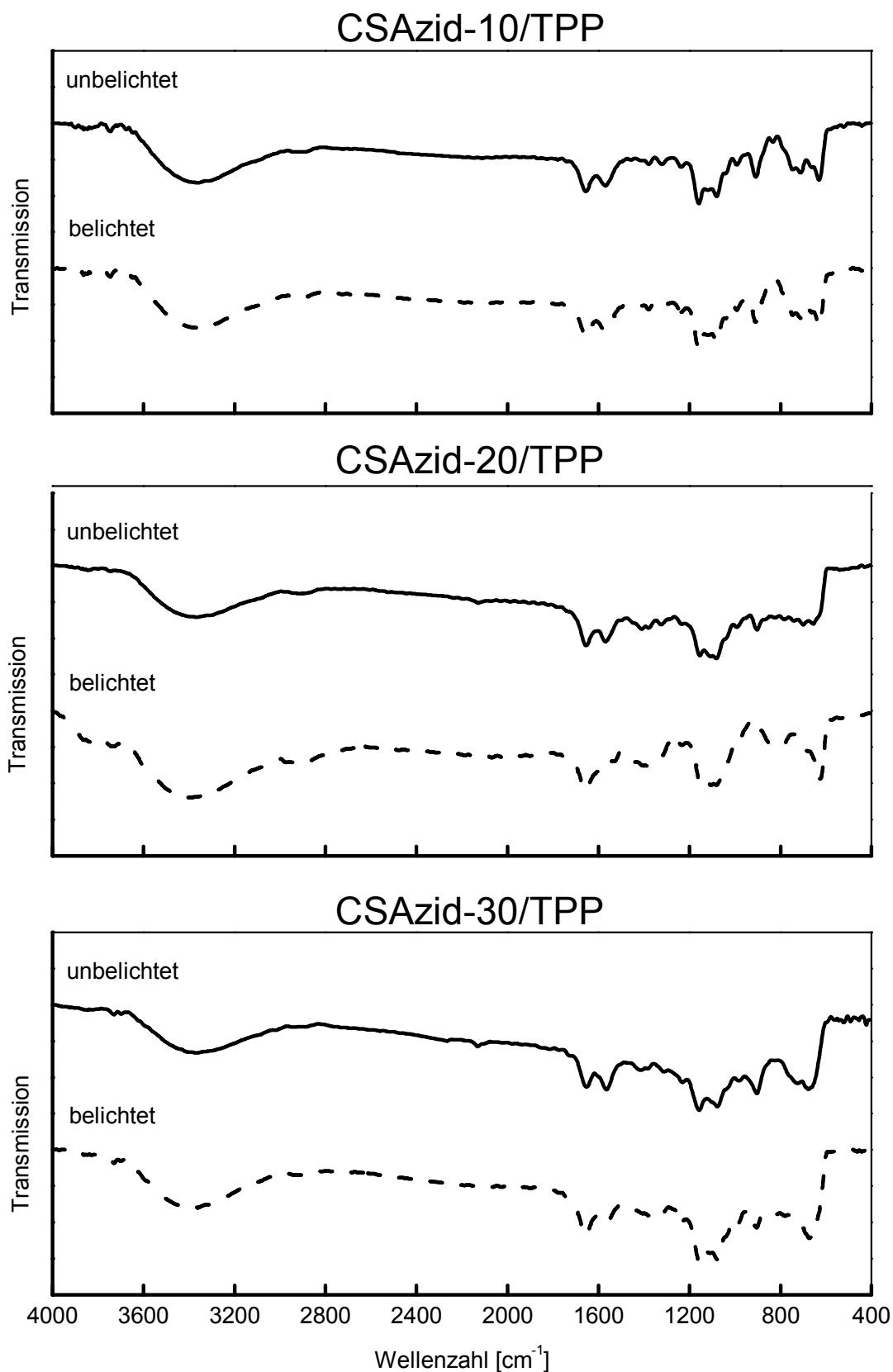


Abbildung 6—35 RAIRS-Messungen der CSAzid/TPP-Beschichtungen vor und nach der Belichtung (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die Beschichtungsdauer betrug 3 Minuten (circa 20 µL), die Belichtung wurde bei 100 mW/cm² bei 290 nm für 3 Minuten durchgeführt. Der markierte Bereich bei 2137 cm⁻¹ kennzeichnet die Azid-Bande.

Im Anschluss daran wurden die Substrate gewaschen und bei 37 °C in Gegenwart einer 1,5 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung inkubiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Titansubstrat mit den herkömmlichen CS-58/TPP-Nanopartikeln beschichtet, bei denen das CS-58 nicht mit Arylazidogruppen funktionalisiert wurde. In regelmäßigen Zeitintervallen wurden von den beschichteten Plättchen durch ellipsometrische Messungen Schichtdicken bestimmt (siehe Abbildung 6—36). Bereits nach dem Waschen kann für das unmodifizierte CS-58/TPP-System beobachtet werden, dass sich die Schichten, wie zu Abbildung 6—7 auf Seite 66 diskutiert, aufgrund der partiellen Löslichkeit von CS-58 von der Oberfläche ablösen. Auf diese Weise kann die Schichtdickenabnahme von etwa 40 nm für die CS-58/TPP-Beschichtung erklärt werden, während bei den CSAzid/TPP-Beschichtungen im Gegensatz dazu keine signifikante Schichtdickenänderung beobachtet werden kann.

Vermutlich fand bei den CSAzid/TPP-Substraten eine Vernetzung der Polymere untereinander statt, wodurch die Löslichkeit in Wasser erheblich gesenkt wurde. Eine kovalente Anbindung des Polymers an die Titanoberfläche kann aber aufgrund des Mechanismus der Photoreaktion des Azids ausgeschlossen werden. Nach 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von Lysozym konnte eine ähnliche Tendenz festgestellt werden. Die CS-58/TPP-Beschichtung wurde weiter degradiert, sodass letztlich nur noch eine Schichtdicke von etwa 10 nm ermittelt werden konnte. Bei den CSAzid/TPP-Beschichtungen hingegen konnten Schichtdicken von über 60 nm gemessen werden, was auf eine ausreichende Stabilität gegenüber Lysozym hindeutet.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die in Abbildung 6—34 dargestellte Lysozymstabilität der CSAzid/TPP-Nanopartikel in Lösung für eine Beschichtung auf Titansubstraten nur wenig Relevanz besitzt. Als Grund für die Diskrepanz der Resultate zwischen Vernetzung in Suspension und Vernetzung auf der Titanoberfläche müssen die nachstehenden Punkte in Betracht gezogen werden. (i) Bei der UV-initiierten Vernetzung der Partikelsuspension werden gequollene Hydrogelpartikel betrachtet. Die Polymerketten sind aufgrund der Lösungsmittelmoleküle klar voneinander getrennt, sodass eine weniger effektive Vernetzung zu erwarten ist. Bei der Zugabe von Lysozym können die Ketten soweit gespalten werden, dass eine Auflösung beobachtet werden kann, die mit einem verringerten Partikeldurchmesser einhergeht. (ii) Bei der Vernetzung der beschichteten Partikel, also eines trockenen Films, stehen die Ketten durch die Abwesenheit des Lösungsmittels in direktem Kontakt. Durch die daraus resultierende effektivere Vernetzung wird die Spaltung

der Ketten durch Lysozym unwahrscheinlicher, da die Spaltstellen im Chitosan schlechter zugänglich sind. Zudem könnten etwaige Spaltprodukte nicht mehr so gut von der Oberfläche abtransportiert werden, da sie über Netzknoten immer noch mit anderen Polymerketten verbunden sind.

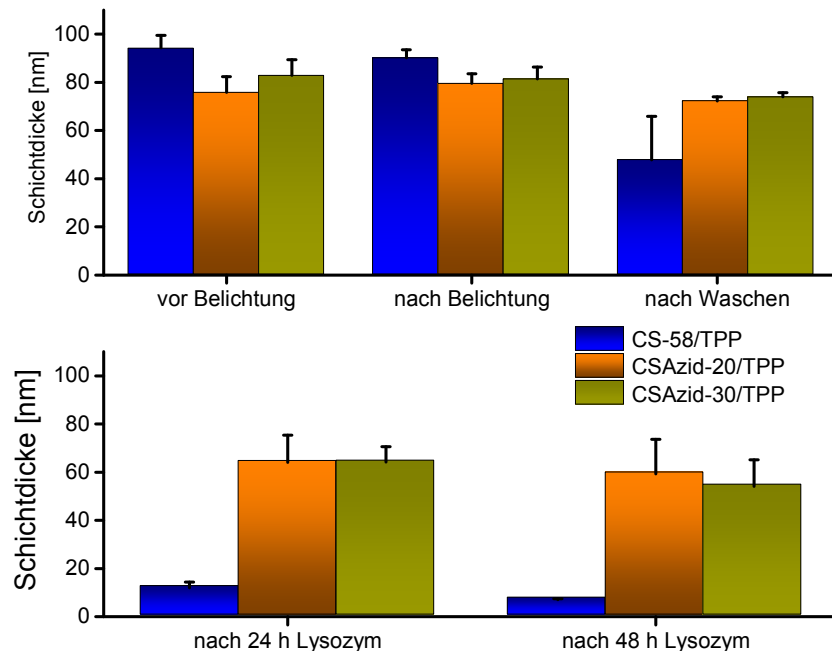


Abbildung 6—36 Inkubation von mit CS/TPP und CSAzid/TPP (20 und 30 % DS) beschichteten Reintitanplättchen (medizinische Qualität 4) in einer 1,5 µg/mL konzentrierten Lysozymlösung (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). n = 3.

Die Einkapselung von IFN β in CSAzid-30/TPP-Nanopartikelsuspension wurde mithilfe des Zell-basierten MX2Luc2-Assays untersucht. Zunächst wurde der Einfluss der UV-Belichtung auf IFN β evaluiert, da durch die Bestrahlung ein Aktivitätsverlust vermutet werden kann. Dafür wurden CSAzid-30/IFN β /TPP- und CS-58/IFN β /TPP-Nanopartikelsuspensionen mit 100 U/mL IFN β hergestellt und mit UV-Licht behandelt. Als Kontrolle dienten sowohl Mx2Luc2-Zellen als auch reines IFN β mit einer Aktivität von 100 U/mL. Die in Abbildung 6—37 dargestellten Ergebnisse zeigen in Bezug auf die gemessene Aktivität keinen Unterschied zwischen der IFN β -Referenz und der CS-58/IFN β /TPP-Nanopartikelsuspension. Der erhöhte Wert für die CSAzid-30/IFN β /TPP-Nanopartikel lässt sich vermutlich mit Ungenauigkeiten des biologischen Nachweissystems erklären. Nichtsdestotrotz kann festgestellt werden, dass ein Aktivitätsverlust des IFN β in Gegenwart der Nanopartikelsuspensionen ausgeschlossen werden kann. Wird hingegen der Einfluss der UV-Bestrahlung beurteilt, so resultiert für die belichteten CSAzid-30/IFN β /TPP- und CS-58/IFN β /TPP-Nanopartikel gegenüber den unbelichteten Proben ein IFN β -Aktivitätsverlust von etwa 50 % bei den CS-58/IFN β /TPP-Proben und sogar 60 % bei den CSAzid-30/IFN β /TPP-Partikeln. Dieser Sachverhalt könnte auf

die Beschädigung des IFN β durch UV-Licht zurückgeführt werden. Des Weiteren wäre eine partielle Inaktivierung des Proteins durch eine kovalente Vernetzung möglich, da die Faltung von IFN β im angebundenen Zustand wahrscheinlich eingeschränkt ist. Verglichen mit dem niedrigen Basalwert der Mx2Luc2-Zellen bei 13.000 RLU/mg sollte sich die Freisetzung von IFN β dennoch quantitativ nachweisen lassen.

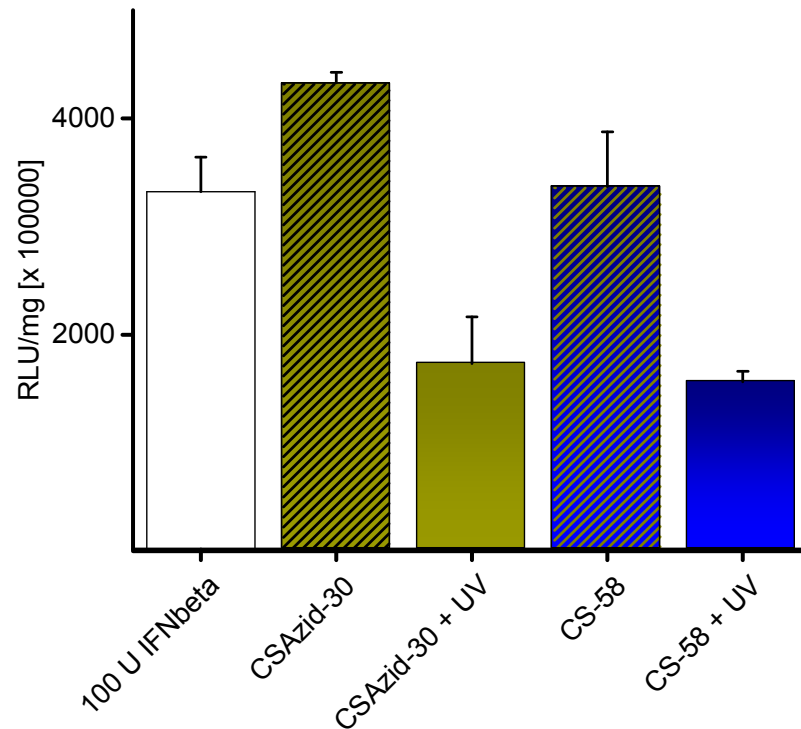


Abbildung 6—37 Einfluss der UV-Belichtung (290 nm; 100 mW/cm²; 3 min) auf die Aktivität von IFN β in Gegenwart der CSAzid-30/TPP und CS-58/TPP-Nanopartikel (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, 100 U IFN β). Als Kontrolle dienten 100 U freies IFN β . Der Basalwert der Mx2Luc2-Zellen lag bei 13.000 RLU/mg.

Anschließend wurden die CSAzid-30/IFN β /TPP-Nanopartikel auf Titanplättchen (Reintitan, medizinische Qualität 4) immobilisiert. Nach der Sprühbeschichtung wurden die Substrate mit UV-Licht der Wellenlänge 290 nm behandelt, um eine Vernetzung zu erreichen. Bei den CSAzid-30/IFN β /TPP-Beschichtungen wurde neben der UV-Belichtung auch der Einfluss von Lysozym getestet. Die in Abbildung 6—38 dargestellten Versuche zeigen eine unspezifische Freisetzung von IFN β aus den nicht-vernetzten CSAzid-30/IFN β /TPP-Beschichtungen, die sich im Verlauf der Inkubation sukzessive verringert. Im Vergleich dazu konnte nach zwei und vier Stunden für die UV-vernetzten CSAzid-30/IFN β /TPP-Beschichtungen eine deutliche niedrigere freigesetzte IFN β -Aktivität gegenüber den nicht belichteten Proben beobachtet werden. Dieser Befund könnte zum einen mit dem Aktivitätsverlust des IFN β infolge der UV-Bestrahlung erklärt werden, welcher bereits in Abbildung 6—37 illustriert wurde. Zum anderen wird vermutet, dass die UV-Belichtung eine kovalente Vernetzung des IFN β mit dem

Chitosan bewirkt, wodurch die Beweglichkeit des Proteins und seine Freisetzung eingeschränkt sind. Es kann jedoch auch sein, dass die UV-initiierte Vernetzung eine Verringerung der Maschenweite zur Folge hat, sodass eine Freisetzung des IFN β durch Diffusion verhindert bzw. verlangsamt wird. Eine vorzeitige Leckage der Beschichtungen könnte somit durch die Vernetzung ausgeschlossen werden. Somit konnte auch bei Zugabe von Lysozym kein Anstieg der IFN β -Konzentration festgestellt werden. Dieser Befund bestätigt die geringe Degradabilität des Systems, wie sie bereits für die Schichtdickenauswertung in Abbildung 6—36 beobachtet wurde.

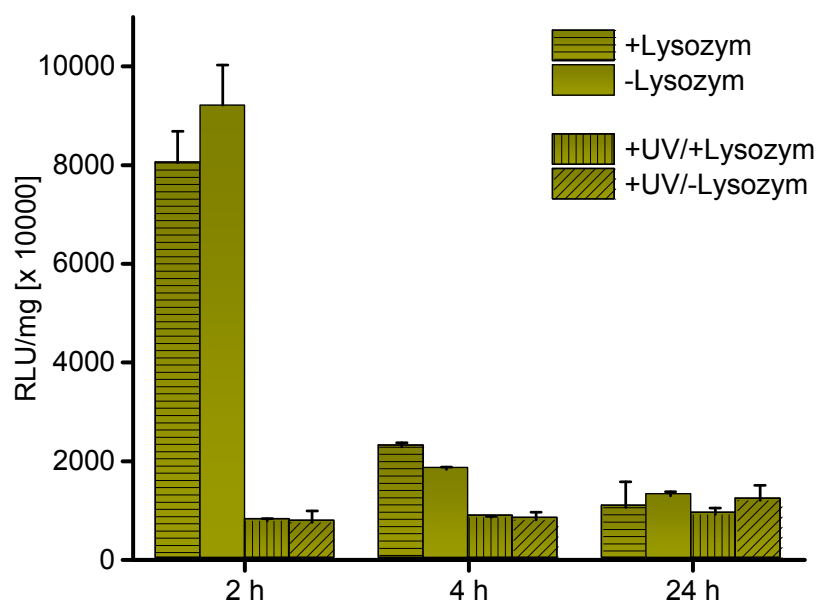


Abbildung 6—38 Evaluation der IFN β -Freisetzung aus vernetzten und unvernetzten CSAzid-30/IFN β /TPP-Nanopartikelbeschichtungen auf Titan (medizinischer Grad 4). Von CSAzid-30 und TPP wurden 1 mg/mL konzentrierte Lösungen in 0,1 % AcOH hergestellt, als Mischungsverhältnis wurde 3:1 gewählt. Mit der Beschichtungsdauer von 3 Minuten wurden etwa 100 U IFN β aufgebracht (ungefähr 20 μ L). n = 3.

Durch die Verwendung des CSAzid-30-Derivats in den Nanopartikeln konnte gezeigt werden, dass eine unspezifische Freisetzung des IFN β vermieden werden kann. Letztlich wird vermutet, dass das Protein aufgrund seiner Vielzahl an freien Aminogruppen innerhalb des Netzwerks kovalent angebunden wurde oder durch die Verringerung der Maschenweite eine diffusionsbedingte Freisetzung verlangsamt ist. Um diesen Ansatz weiterzuverfolgen, wäre eine kovalente Vernetzung der Nanopartikel sinnvoll, bei der eine Interaktion mit dem Wirkstoff durch die gezielte Einführung von Schutzgruppen oder einer Maskierung ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren müssten Enzym-labile Stellen eingeführt werden, um eine spezifische Freisetzung zu erreichen.

6.2.4 Zusammenfassung

Nach den in Kapitel 6.2 vorgestellten IFN β -Einkapselungsstudien, die auch in Abwesenheit des Enzyms Lysozym eine Freisetzung des Modellwirkstoffs zeigen, wurde eine Modifikation des CS/TPP-Systems angestrebt. Zunächst wurde mittels Thiol-En-Clickchemie die Substitution des TPP-Crosslinkers durch entsprechende phosphonathaltige Verbindungen untersucht. Dabei wurden dithiolhaltige aliphatische Edukte in einer Thiol-En-Reaktion mit Phosphonatgruppen versehen, welche sukzessive zu den jeweiligen Natriumsalzen der Phosphonsäuren hydrolysiert wurden. Aufgrund der pKa-Werte von literaturbekannten Phosphonsäuren wurde eine teilweise Dissoziation der hergestellten Phosphonsäuren vermutet. Trotz der daraus resultierenden negativen Ladung konnte keine Nanopartikelbildung mit Chitosan beobachtet werden.

Des Weiteren wurde das CS-58/TPP-Nanopartikelsystem modifiziert, indem CS-58 mit UV-vernetzbaaren arylazidohaltigen Gruppen versehen wurde. Durch diesen Ansatz sollte die Stabilität der Nanopartikel in wässrigen Medien und in Gegenwart von Lysozym erhöht werden. Insgesamt wurden drei CSAzid-Derivate mit Substitutionsgraden von 0,8 %, 3 % und 6 % hergestellt, die durch ionotrope Gelierung mit TPP zu Nanopartikeln mit geringer Polydispersität umgesetzt werden konnten. Mithilfe von Dynamischen Lichtstreuexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von physiologischen Lysozymkonzentrationen zu UV-vernetzten CSAzid/TPP-Nanopartikeln mit einer Partikelgrößenabnahme einherging, wie sie bereits bei den unmodifizierten CS-58/TPP-Suspensionen beobachtet werden konnte. Nach der Beschichtung der CSAzid/TPP-Nanopartikel auf Titansubstrate und einer sukzessiven photochemischen Vernetzung konnte allerdings die Stabilität gegenüber einem enzymatischen Abbau durch Lysozym deutlich verbessert werden. Damit konnte eine Optimierung der Stabilität des herkömmlichen CS-58/TPP-Systems erreicht werden. Die UV-Belichtung resultierte allerdings in einem Aktivitätsverlust des IFN β von ungefähr 50 – 60 %. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Luciferasetests konnten dennoch Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt werden. Inkubierte UV-vernetzte CSAzid-30-Beschichtungen zeigten unabhängig von der Anwesenheit von Lysozym keine signifikante Freisetzung des Proteins über einen Zeitraum von 24 h. Dieser Befund könnte auf eine kovalente Anbindung des IFN β in den Beschichtungen oder auf eine Verringerung der Maschenweite des Hydrogelnetzwerks hinweisen, die eine Freisetzung nahezu unmöglich macht. Aus unvernetzten CSAzid-

30/IFN β /TPP-Beschichtungen konnte hingegen zumindest nach 2 h ein deutlicher Anstieg der IFN β -Konzentration beobachtet werden, der für eine Auflösung beziehungsweise Degradation der Schichten spricht.

6.3 Alginat/Peptid-Nanopartikel

Die Verwendung des Biopolymers Alginat für die Entwicklung von Wirkstofffreisetzungssystemen wurde bereits ausführlich in Kapitel 4.2 erläutert. Für den Einsatz im medizinischen Bereich muss strengstens auf die Reinheit des Alginats geachtet werden, um das Risiko einer Immunantwort zu minimieren, die durch Kontaminanten wie Proteine oder Endotoxine hervorgerufen werden kann.²²⁷ Zusätzlich bestätigen mehrere Veröffentlichungen einen Einfluss von Parametern, wie dem Molekulargewicht²²⁸, der Viskosität der Lösung²²⁹ oder dem Verhältnis von Mannuronsäure- und Guluronsäureanteil, auf die Biokompatibilität von Alginat-basierten Materialien im Körper.²³⁰ In Kombination mit multivalenten Kationen wie Calcium oder Barium wurde die Gelierbarkeit von aufgereinigtem Alginat für die Applikation von Proteinen, wie unter anderem humanem Hämoglobin oder Insulin, genutzt.¹⁴⁹ Die Wirkstofffreisetzung erfolgte zumeist als Konsequenz von Diffusionsprozessen, bei denen keine temporäre Kontrolle über den Freisetzeitpunkt möglich war.

Im Weiteren werden Stimuli-responsive Alginat/Peptid-Nanopartikel beschrieben, welche in Anwesenheit von entsprechenden Proteasen spezifisch degradiert werden können. Nach der Aufreinigung des Alginats mit anschließender Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelpermeationschromatographie (GPC) und des Guluronsäure- zu Mannuronsäureverhältnisses per ¹H-NMR-Spektroskopie wurde die Nanopartikelbildung mit Enzym-labilen Peptidlinkern untersucht.

6.3.1 Charakterisierung von Natriumalginat

Natriumalginat wurde gemäß einer leicht modifizierten Vorschrift von PROKOP et al. vor der Verwendung als Nanopartikelkomponente durch Dialyse und die Behandlung mit Aktivkohle aufgereinigt.²³¹ Das purifizierte Natriumalginat wurde anschließend durch ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert, um das Mannuronsäure- zu Guluronsäureverhältnis (M/G) zu untersuchen, welches bei der Biokompatibilität²³⁰ und den Gelationseigenschaften¹³⁸ eine wichtige Rolle spielt. Für die Bestimmung der Alginatzusammensetzung wurden ¹H-NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen (25, 40, 60, 70 und 80 °C) aufgenommen, um die für die Auswertung benötigten Signale vom Lösungsmittelsignal (D₂O mit DSS als Referenz) klar zu separieren. Bei einer Messtemperatur von 80 °C konnten die zu den anomeren Protonen gehörenden charakteristischen Signale

in der Tieffeldregion ausreichend aufgelöst werden. Außerdem konnte durch die Temperaturerhöhung die Viskosität so beeinflusst werden, dass die Peakbreite und das DOH-Resonanzsignal verschoben wurden. In Abbildung 6—39 sind die bei den unterschiedlichen Temperaturen gemessenen ^1H -NMR-Spektren von Natriumalginat dargestellt.

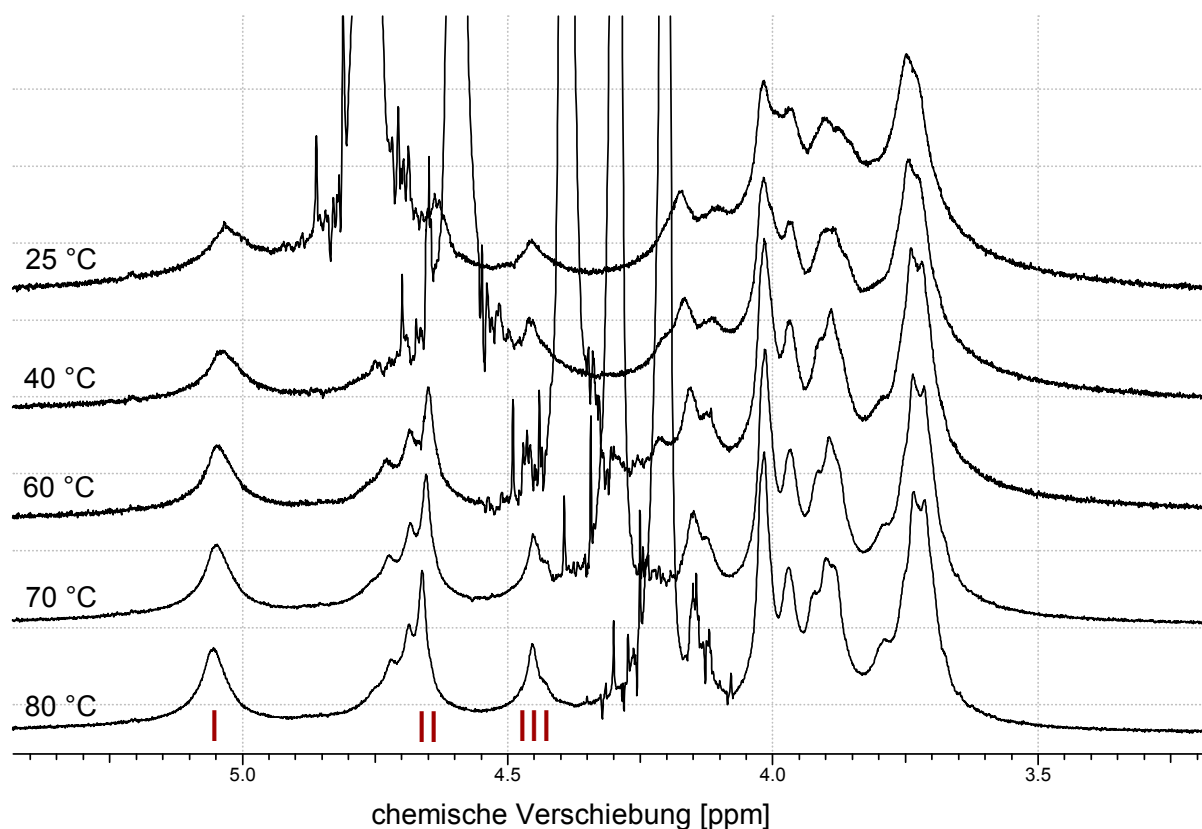


Abbildung 6—39 ^1H -NMR-Spektren von Natriumalginat mit denen für die Auswertung relevanten Signalen I, II und III (gemessen bei 25, 40, 60, 70 und 80 °C in D_2O + DSS).

In der Tieffeldregion des 80 °C-Spektrums konnten spezifische Signale für die von der Guluronsäure stammenden anomeren Protonen G-1 bei 5,10 ppm (Signal I) und G-5 bei 4,40 ppm (Signal III) und für die anomeren Protonen der Mannuronsäure M-1 zusammen mit den C-5-Protonen der alternierenden Blöcke zwischen 4,69 und 4,78 ppm (Signal II) beobachtet werden. Nach GRASDALEN et al. können unter Verwendung der Integrale der Signale I, II und III neben dem Uronsäure-Verhältnis auch die Blockstrukturen des Alginats bestimmt werden.²³² Die Zuordnung der Signale ist im experimentellen Teil 8.6.1 auf Seite 193 anhand der Strukturformel von Alginat dargestellt. Dadurch ergibt sich ein M/G-Verhältnis von 1,3 mit einem 1,5-fachen Überschuss an Mannuronsäure-Mannuronsäure-Blöcken (MM) im Polymer. Zusätzlich wurden Molekulargewichtsbestimmungen durch Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Ein exemplarisches Chromatogramm von Natriumalginat mit den Brechungsindex- (RI) und Lichtstreuensignalen (LS) ist in Abbildung

6–40 dargestellt. Das zum Alginat gehörende Hauptsignal bei 12 Minuten wird von einem kleineren Signal begleitet (bei 18 Minuten), welches lediglich durch den RI-Detektor identifiziert werden kann. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dieser Peak ein sehr geringes Molekulargewicht besitzt und vermutlich von den Natrium-Gegenionen des Alginats stammt.

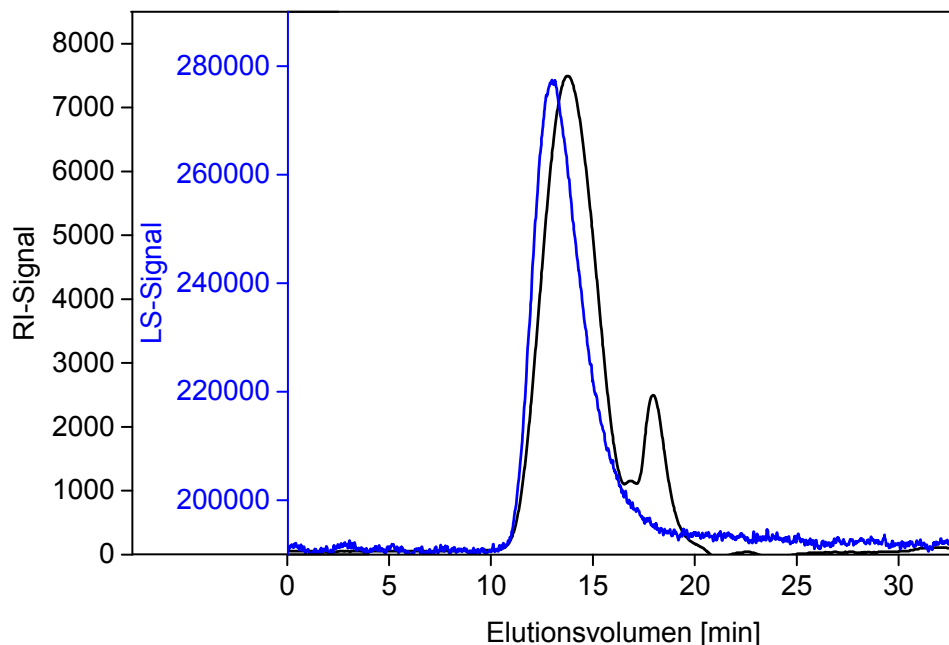


Abbildung 6—40 Chromatogramm der GPC-Messung von Natriumalginat in Phosphatpuffer (pH 7,4; 0,1 M NaCl; 0,05 % Natriumazid)

Die Auswertung der Chromatogramme ergab für das Molekulargewicht des Hauptsignals einen Wert von 72 ± 1 kDa. Wird anschließend der Polymerisationsgrad des verwendeten Alginats ermittelt, indem mit einem Monomer-Molekulargewicht von 176 g/mol gerechnet wird, ergibt sich 411 ± 7 . Wenn zusätzlich ein Natrium-Gegenion pro Uronsäure in die Berechnung eingeht, ergibt sich ein Gesamtmolekulargewicht von 82 ± 1 kDa.

6.3.2 Charakterisierung von Alg/ α PLL-Nanopartikeln

Analog zu dem CS/TPP-Nanopartikelsystem können Alginat/Peptid-Nanopartikel ebenfalls durch ionotrope Gelierung in wässriger Umgebung hergestellt werden. Dabei wurde hier zu einer Alginatlösung (Alg) als entsprechendes Gegenion α -Poly-L-Lysin (α PLL) oder die Aggrecanase-labile Sequenz NITEGE bzw. NVTEGE hinzugegeben, welche endständig kationische Lysinsequenzen enthält. Nach anschließender Homogenisierung der Probe mit einer Eppendorfpipette wurden zur Partikelcharakterisierung zunächst Dynamische Lichtstreuexperimente durchgeführt.

Erste Experimente wurden mit Natriumalginat in Kombination mit der kommerziell erhältlichen Polyamino­säure α PLL (Polymerisationsgrad 10) durchgeführt. Durch die Vielzahl an Carboxylgruppen weist das Alginat eine negative Ladung auf,²³³ währenddessen beim α PLL eine positive Ladung durch die Lysineinheiten resultieren sollte. Wie bereits in Kapitel 6.1.1 erläutert, lassen sich signifikante Partikelparameter durch das Mischungsverhältnis und den pH-Wert des Mediums beeinflussen. Mit einer Konzentration der Komponenten von 1 mg/mL in PBS wurde zunächst das optimale Mischungsverhältnis von Alginat zu α PLL mit 4:1 evaluiert. So konnten monomodale Partikelgrößenverteilungen mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 450 ± 80 nm und einem Polydispersitätsindex von $0,21 \pm 0,013$ erhalten werden. Eine Variation des Mischungsverhältnisses von Alginat zu α PLL zu 2:1 und 3:1 resultierte in kleineren Partikeln mit 284 ± 61 nm beziehungsweise 349 ± 65 nm, die allerdings einen deutlich höheren Polydispersitätsindex von 0,3 bis 0,4 aufwiesen. Der Anstieg der Partikelgröße mit zunehmenden Alginatgehalt hängt vermutlich mit anionischen Wechselwirkungen zusammen. Alginat besitzt einen pKa-Wert von 3,65, wonach die Carboxylgruppen des Polymers, also die Mannuronsäure- und die Guluronsäureinheiten, in PBS dissoziiert vorliegen sollten.²³⁴ Bei einer Erhöhung des Alginatanteils ist daher bei gleichbleibendem pH-Wert eine Zunahme der Partikelgröße zu erwarten, da es innerhalb des Partikels zu einer steigenden Abstoßung der Alginatketten kommt.

Zusätzlich wurde die pH-Wertabhängigkeit der Partikelgröße untersucht, wobei das Mischungsverhältnis von 4:1 konstant gehalten wurde (siehe Abbildung 6—41). Die Versuche zeigten einen bedeutenden Einfluss des pH-Wertes auf die Größe der Partikel. Bei der Verringerung des pH-Werts auf pH 5 respektive pH 3, konnte eine Verringerung der Partikelgrößen auf 427 ± 32 nm bzw. 298 ± 35 nm beobachtet werden. Laut DENG et al. findet durch die Verringerung des pH-Wertes unter den pKa-Wert des Alginats (pKa 3,65) eine Protonierung der Carboxylgruppen statt und die Ladungsdichte der Alginatketten nimmt ab.²³⁵ Zudem können sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen der Alginatketten ausbilden, die eine kompaktere Struktur und somit eine geringere Partikelgröße nach sich ziehen. Bei höheren pH-Werten, wie bei pH 5, sind die meisten Carboxylgruppen aufgrund des pKa 3,65 deprotoniert und die elektrostatische Repulsion führt zu einer Knäuelaufweitung des negativ geladenen Alginats. Daraus resultieren die höheren Partikelgrößen. Dieser Effekt nimmt bis pH 7,4 (PBS) zu, obwohl der Zuwachs nicht

mehr so signifikant ist, wie zwischen pH 3 und pH 5. Als Grund könnte man einen Einfluss der Salzkonzentration anführen, wodurch einige der deprotonierten Carboxylgruppen abgeschirmt werden und auf diese Weise die elektrostatische Repulsion etwas minimieren.²³⁶

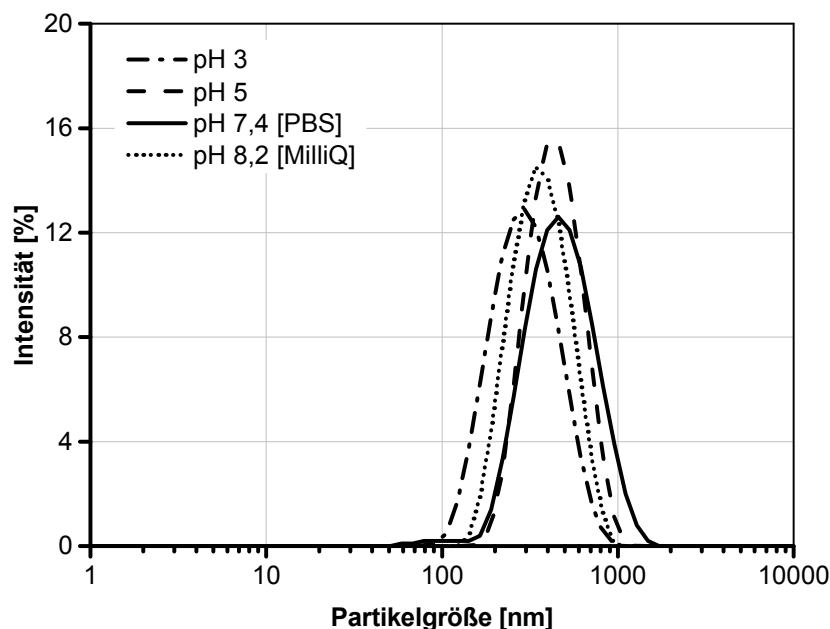


Abbildung 6—41 Partikelgrößenverteilung der Alg/αPLL-Nanopartikel bei verschiedenen pH-Werten (je 1 mg/mL, Volumenverhältnis 4:1)

Die Partikelgröße der Alg/αPLL-Nanopartikel wurde darüber hinaus mittels Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) im Rahmen einer Gerätevorführung von Herrn ROLF NITZSCHE von MALVERN INSTRUMENTS überprüft. Die NTA-Methode nutzt analog zur DLS die Eigenschaften Lichtstreuung und BROWN'sche Molekularbewegung, indem das an den Partikeln gestreute Laserlicht durch ein Mikroskop visualisiert wird. Durch die Verwendung einer Videokamera kann zusätzlich die Bewegung der Partikel aufgezeichnet und somit theoretisch jeder Partikel isoliert betrachtet werden. Mithilfe der STOKES-EINSTEIN-Gleichung erfolgt die Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers.²³⁷ Die Alg/αPLL-Nanopartikel wurden durch die in Abbildung 6—42a gezeigten fünf Einzelmessungen in Reinstwasser charakterisiert. Dabei wurde eine mittlere Partikelgröße von 211 ± 6 nm erhalten, die eine signifikante Abweichung vom DLS-Wert der Alg/αPLL-Partikel von 330 ± 35 nm zeigt. Für die NTA-Messungen werden gegenüber den DLS-Resultaten bei beiden Nanopartikelformulierungen kleinere Partikelgrößen erhalten. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich in der Auswertung der Messergebnisse begründet, da für die DLS zur Berechnung der Partikelgrößen gemäß Kapitel 5.1.2 auf Seite 43 die Intensität-gewichtete Größenverteilung verwendet wurde, die bereits in Anwesenheit weniger größerer Teilchen einen höheren Partikeldurchmesser suggeriert. Bei der NTA-Methode werden die Partikel Anzahl-gewichtet ausgewertet und liefern

demnach kleinere Partikelgrößen. Durch die Umrechnung der Intensität-gewichteten Verteilung in eine Anzahl-gewichtete Verteilung resultieren Partikelgrößen von 208 ± 6 nm, die direkt mit den Ergebnissen der NTA-Messung korrelierbar sind. Des Weiteren konnte die Bewegung der Partikel mithilfe des Mikroskops aufgezeichnet werden. Abbildung 6—42b zeigt einen exemplarischen Screenshot eines aufgenommenen Videos, der eine sphärische Partikelmorphologie vermuten lässt.

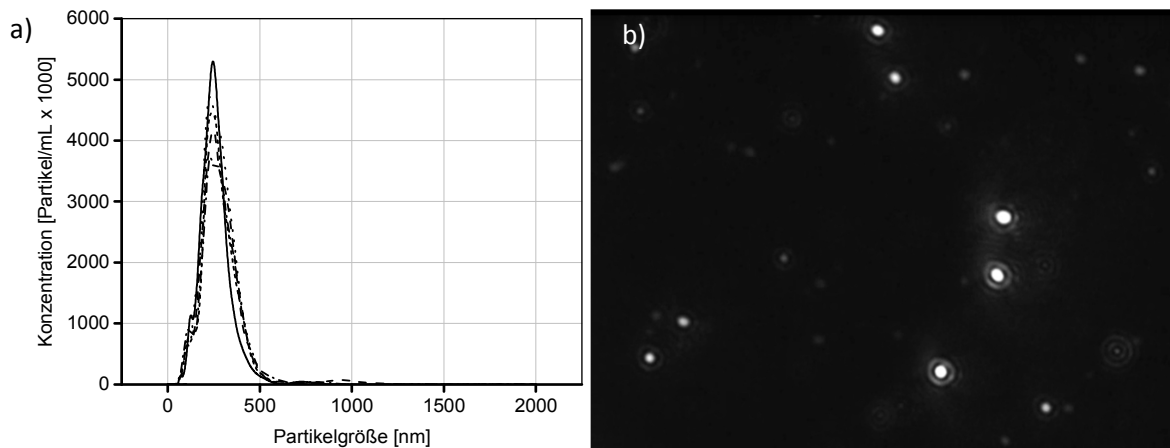


Abbildung 6—42 a) Ergebnisse der NTA-Messungen von Alg/αPLL (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1). Die Probe wurde 1:1.000 verdünnt. b) Exemplarischer Screenshot der in a) vermessenen Probe.

Zusätzlich wurden die Alginat/αPLL-Nanopartikel durch asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AFFFF = AF4) untersucht, bei der die Probe in einem Trennkanal durch ein senkrecht zur Flussrichtung angelegten Flüssigkeitsstrom fraktioniert werden kann.^{xxvi} Die Messungen bestätigten die Anwesenheit definierter Nanopartikel mit einer relativ engen Verteilungsbreite von 1,08. Zusätzlich konnten der Gyrationradius mit 273 ± 6 nm und der hydrodynamische Radius der Partikel mit 256 ± 4 nm bestimmt werden. Bei der Umrechnung des hydrodynamischen Radius in eine Partikelgröße ergibt damit sich ein Wert von 512 ± 8 nm. Da bei den AFFFF-Untersuchungen ein PBS-Puffer als Eluent verwendet wurde, lässt sich dieser Wert mit den DLS-Messungen in PBS in Einklang bringen, bei denen eine mittlere Partikelgröße von 450 ± 35 nm erhalten wurde. Durch die Berechnung des Quotienten aus Gyrationradius und hydrodynamischen Radius konnte ein Formfaktor von $1,08 \pm 0,04$ nm ermittelt werden, der für sphärische Partikel mit inhomogener Oberfläche charakteristisch ist.²³⁸ Somit konnten die bereits in Abbildung 6—42 beobachteten, kugelförmigen Partikel durch AFFFF-Messungen verifiziert werden (Anhang 10-5).

^{xxvi} Die AFFFF-Messungen wurden am Institut für Polymerforschung in Dresden (IPF) zusammen mit Frau Dr. Susanne Boye durchgeführt.

Zur weiteren Überprüfung der Nanopartikelmorphologie wurden die bereits in Kapitel 6.1.1 erläuterten Kryo-REM-Messungen an der Universität Potsdam durchgeführt. Die eingefrorene Alg/ α PLL-Nanopartikelprobe (in Reinstwasser) wurde seziiert und mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Gemäß Abbildung 6—43 konnten neben sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser 50 – 80 nm auch größere Strukturen mit 200 – 300 nm beobachtet werden. Zudem scheinen die untersuchten Partikel eine Art Vernetzung untereinander einzugehen, da sich „aderartige“ Verbindungen zwischen den Strukturen beobachten lassen. Dieser Befund deutet auf die Interaktion der Partikel untereinander hin. Eventuell können die Polykationen des α PLL die Polyanionen des Alginats nicht vollständig kompensieren, sodass eine Vernetzung von benachbarten Partikeln angenommen werden kann. Hierzu muss erwähnt werden, dass die Proben für die Kryo-REM-Messungen nicht zeitnah analysiert werden konnten und daher etwa 14 Tage zwischen Präparation und eigentlicher Messung vergingen. Angesichts einer möglichen Alterung der Nanopartikel wäre eine Messung direkt nach der Herstellung ratsam. Die Ergebnisse der Kryo-REM-Untersuchungen können daher nicht direkt mit den Methoden DLS, NTA und AFFF verglichen werden.

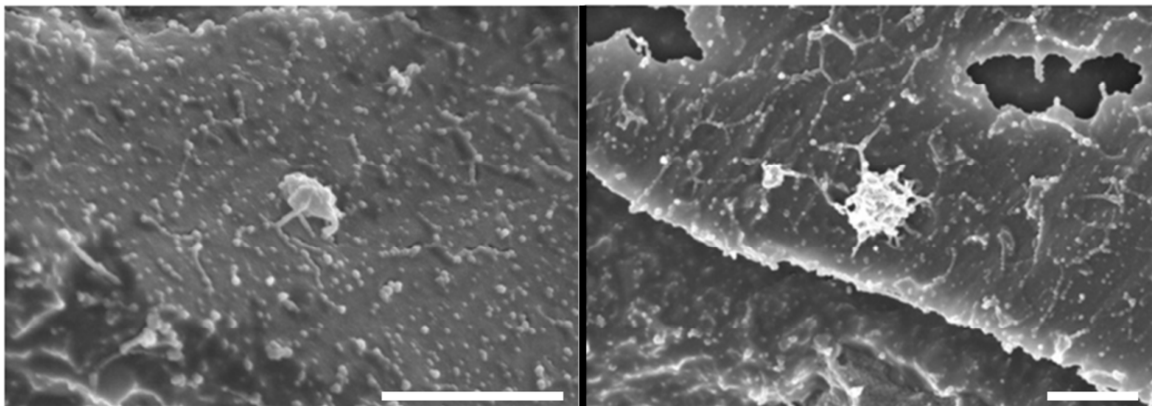


Abbildung 6—43 Kryo-REM-Aufnahmen der Alg/ α PLL-Nanopartikel (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

In Tabelle 6-5 sind übersichtshalber die ermittelten Partikelgrößen der einzelnen Messmethoden für die Alg/ α PLL-Partikel in Reinstwasser zusammengefasst.

Tabelle 6-5 Zusammenfassung der erhaltenen Partikelgrößen der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) mit den Methoden Dynamische Lichtstreuung (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AFFFF) und Kryo-Rasterelektronenspektroskopie (Kryo-REM).

Methode	Partikelgröße
DLS	$330 \pm 35 \text{ nm}^+$, $450 \pm 35 \text{ nm}'$
NTA	$211 \pm 6 \text{ nm}^+$
AFFFF	$512 \pm 8 \text{ nm}'$
Kryo-REM	$50\text{-}80 \text{ nm}^{+*}$
	$200\text{-}300 \text{ nm}^{+ \#}$

Messung in ⁺Reinstwasser oder in [']PBS

*kleine Partikel [#]größere Strukturen

Im Anschluss an die Partikelgrößenmessungen wurde die pH-Wertabhängigkeit des Zetapotentials für das Alg/ α PLL-System untersucht. Laut PUJALA lässt sich anhand des Zetapotentials die Stabilität der Nanopartikeldispersion abschätzen. Hierbei deuten Werte unter -30 mV und über +30 mV auf stabile kolloidale Systeme hin, da die Abstoßung der Partikel untereinander relativ groß ist. Dadurch wird eine Aggregation vermieden, die zu einer Präzipitation der Nanopartikel führen würde.²³⁹ Aufgrund des anionischen Charakters des Alginats lassen sich für alle betrachteten Proben negative Zetapotentiale bestimmen, welche sich allerdings deutlich voneinander unterscheiden. Für die Messungen in PBS bei pH 7,4 konnte ein Wert von $-33 \pm 3 \text{ mV}$ beobachtet werden, während die Partikel bei pH 3 und pH 5 deutlich negativere Zetapotentiale von $-54 \pm 1 \text{ mV}$ respektive $-70 \pm 1 \text{ mV}$ aufwiesen. Der beobachtete Trend lässt sich mit dem pKa-Wert des Alginats erklären, der bei 3,65 liegt.²³⁴ Durch die Verringerung des pH-Wertes von pH 7,4 auf pH 5 dissoziieren die Carboxylgruppen des Alginats, während die Lysineinheiten des α PLL (pKa 10) weiterhin protoniert sind. Daraus resultiert eine negative Ladung der Alginatketten und das Zetapotential von $-70 \pm 1 \text{ mV}$ für die Alg/ α PLL-Partikel. Wird der pH-Wert weiter auf pH 3 erniedrigt, wird der pKa-Wert des Alginats unterschritten. Dadurch kommt es zu einer partiellen Protonierung der Carboxylgruppen und das Zetapotential der Alg/ α PLL-Partikel steigt auf $-54 \pm 1 \text{ mV}$ an. Zur weiteren Überprüfung des pH-Werteinflusses wurde die Nanopartikelbildung des Alg/ α PLL-Systems auch in Reinstwasser untersucht, bei der ein pH-Wert von 8,2 gemessen werden konnte. Die Partikel wiesen bei der anschließenden Charakterisierung ein Zetapotential auf, welches mit $-48 \pm 1 \text{ mV}$ zwischen den Werten der Präparation in PBS und bei pH 3 lag. Die unterschiedlichen Zetapotentiale der Alg/ α PLL-Nanopartikel in PBS und Reinstwasser lassen sich wahrscheinlich auf die hohen

Salzkonzentrationen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat im Phosphatpuffer zurückführen. Dadurch wird in einem neutralen pH-Wertbereich gemessen, in dem alle Carboxylgruppen des Alginats dissoziiert vorliegen sollten. Durch die hohen Salzkonzentrationen könnten die ionischen Wechselwirkungen allerdings abgeschirmt sein, wie es bereits bei der Diskussion der Partikelgröße auf Seite 125 in Betracht gezogen wurde. Daher weisen die in PBS hergestellten Nanopartikel ein vergleichsweise schwach negatives Zetapotential auf. Infolge der ionischen Abschirmung der Carboxylgruppen durch den Salzeinfluss des PBS-Puffers stehen für die Partikelbildung weniger negative Ladungen zur Verfügung als bei den Alg/ α PLL-Nanopartikeln in Reinstwasser. Folglich resultiert für diese Partikel das „positivste“ Zetapotential von -33 ± 3 mV, wonach laut PUJALA die Stabilität der Alg/ α PLL-Nanopartikel in PBS gegenüber den anderen Konditionen am schwächsten sein sollte.²³⁹ Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die betrachteten Alg/ α PLL-Nanopartikel unabhängig vom pH-Wert nicht zu einer Aggregation oder Koagulation neigen sollten.

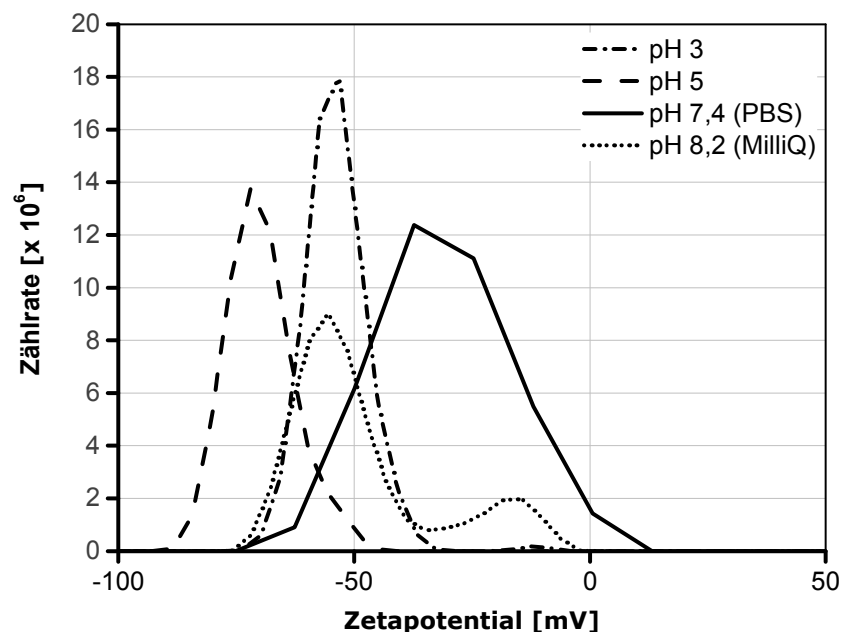


Abbildung 6—44 Zetapotential der Alg/ α PLL-Nanopartikel bei verschiedenen pH-Werten (je 1 mg/mL, Volumenverhältnis 4:1).

Um den Einfluss der PBS-Salze bei der Partikelbildung besser verstehen zu können, wurde in einem weiteren Experiment das Alg/ α PLL-System in Reinstwasser angesetzt. Anschließend wurden die Partikelgröße und das Zetapotential gemessen, bevor eine der Konzentration der PBS-Lösung entsprechende Menge an Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat und Kaliumdihydrogenphosphat hinzu-

gefügt wurde. In der Folge wurden die Partikel charakterisiert, mit den Formulierungen in Reinstwasser und PBS verglichen und in die Ergebnisse Tabelle 6-6 zusammengefasst. Wie bereits eingangs erwähnt, weisen die Alg/ α PLL-Partikel in PBS einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 450 ± 80 nm und ein Zetapotential von ungefähr -33 ± 3 mV auf. Bei der Präparation in Reinstwasser wurden deutlich niedrige Partikelgrößen von 330 ± 35 nm erhalten und die Oberflächenladung ist mit -48 ± 1 mV im Vergleich dazu etwas negativer. Durch die nachträgliche Zugabe der PBS-Salze in den entsprechenden Konzentrationen konnten die Partikelgröße und das Zetapotential so beeinflusst werden, dass sich mit 447 ± 8 nm und -32 ± 1 mV ähnliche Werte wie bei den Alg/ α PLL-Partikeln in PBS ergaben. Dieser Befund beweist den dynamischen Charakter der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspension, welcher sich durch den simplen Zusatz von Substanzen wie Salzen verändern lässt. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Partikelsuspension bei der Einbringung in den menschlichen Organismus in Gegenwart von physiologischen Salzkonzentrationen ähnlich verhalten würden.

Tabelle 6-6 Partikelgröße und Zetapotential für Alginat/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen in PBS, Reinstwasser und in Reinstwasser mit Zugabe der PBS-Salze (je 1 mg/mL, Volumenverhältnis 4:1).

Methode	Partikelgröße	Zetapotential
Alg/ α PLL in PBS	450 ± 80 nm	-33 ± 3 mV
Alg/ α PLL in Reinstwasser	330 ± 35 nm	-48 ± 1 mV
Alg/ α PLL in Reinstwasser + PBS-Salze	447 ± 8 nm	-32 ± 1 mV

Aufgrund der Zetapotentiale der Alg/ α PLL-Nanopartikeln bei verschiedenen pH-Werten sind laut PUJALA stabile Suspensionen zu erwarten.²³⁹ Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden zunächst die Partikelgrößen des Alg/ α PLL-Systems in PBS bei 37 °C verfolgt. Wie in Abbildung 6—45 zu sehen, verändern sich die hydrodynamischen Durchmesser in dem betrachteten Zeitraum von drei Tagen kaum, sodass von einer ausreichenden Stabilität ausgegangen werden kann. Zusätzlich wurde die Degradabilität der Partikel in Gegenwart der Enzyme Trypsin, Thermolysin und Alg-Lyase untersucht. Für diese Experimente wurden die Nanopartikelsuspensionen nach dem Standardprotokoll hergestellt und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Enzymlösung hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 2,5 μ g/mL Enzym zu erhalten. Die Partikelgrößen wurden dann im Verlauf von etwa drei Tagen in regelmäßigen Intervallen per Dynamischer Lichtstreuung gemessen. Die Inkubation in Gegenwart von Trypsin führt zu einer deutlichen Reduktion des

hydrodynamischen Durchmessers der Partikel. In den ersten 24 Stunden kann eine signifikante Partikelgrößenabnahme von anfänglichen 470 nm auf 300 nm festgestellt werden, bevor eine wesentliche Verlangsamung dieser Reduktion auftritt, die letztlich zu einer Partikelgröße von 280 nm nach 72 h führt. Die Veränderung der Partikelgröße als Folge der Enzymzugabe kann auf die Degradation des Alg/ α PLL-Systems zurückgeführt werden. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 erwähnt, spaltet Trypsin bevorzugt C-terminal von Arginin- und Lysinresten.^{159–161} Da der kationische Vernetzer α PLL ein aus Lysinresten aufgebautes Homopolymer ist, ist eine Hydrolyse als Folge der Trypsinzugabe sehr wahrscheinlich. Die Abnahme der Partikelgrößen der Alg/ α PLL-Formulierung könnte damit auf die Spaltung der Peptidkomponente zurückgeführt werden. Thermolysin hydrolysiert laut SHUKLA et al. Peptide N-terminal zu hydrophoben Aminosäuren mit großen Seitenketten wie Isoleucin (I), Leucin (L), Valin (V) und Phenylalanin (F).¹⁶² Thermolysin sollte somit aufgrund der Aminosäuresequenz nicht zur Degradation von α PLL und den Nanopartikeln führen. Diese Vermutung konnte mit dem gezeigten Dynamischen Lichtstreuexperiment bestätigt werden, da keine Veränderung der Partikel in Gegenwart von Thermolysin beobachtet werden konnte. Nachdem mit Trypsin und Thermolysin explizit die Degradation der Peptidkomponente α PLL untersucht wurde, konnte durch die Zugabe von Alginat-Lyase die Spaltung des Alginats evaluiert werden.¹⁵⁵ Gemäß Abbildung 6–45 steigt die Partikelgröße als Konsequenz der Zugabe von Alginat-Lyase innerhalb von einer Stunde drastisch von etwa 450 nm auf etwa 1.600 nm an, bevor eine deutliche Reduktion festgestellt werden kann. Aufgrund der beobachteten Präzipitation wird geschlussfolgert, dass die Partikel in Gegenwart des Enzyms aggregieren und daraus die Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser resultiert. Übersteigt die Partikelgröße einen Schwellenwert, fallen die Aggregate am Boden der Küvette als weißer Feststoff aus und stehen nicht mehr für die Dynamischen Lichtstreuemessungen zur Verfügung. Die Degradation des Polysaccharids in Gegenwart von Alginat-Lyase (Alg-Lyase) wurde zusätzlich durch Viskositätsmessungen überprüft, die eine drastische Abnahme der kinematischen Viskosität der Lösung während der Inkubationsdauer von sechs Tagen zeigten (siehe Anhang 10-6).

Letztlich kann geschlussfolgert werden, dass die Alg/ α PLL-Nanopartikel im Rahmen der Untersuchungen in einer PBS-Lösung eine ausreichende Stabilität besitzen. Während der Koinkubation mit entsprechenden Enzymen, die entweder das Homopolypeptid α PLL (durch Trypsin) oder das Biopolymer Alginat (durch Alginat-Lyase) spalten, konnte eine

Veränderung der Partikelgrößen festgestellt werden. Daraus wurde eine Degradabilität des Alg/ α PLL-Systems in Anwesenheit entsprechender Enzyme geschlussfolgert. Neben PBS wurde die Stabilität der Partikel auch bei 37 °C in Reinstwasser evaluiert, da dieses Medium für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde. Diese Experimente bestätigten die Stabilität der Suspension über den betrachteten Zeitraum von 72 h anhand der konstanten Partikelgrößen (Diagramm im Anhang 10-7). Die Kryo-REM-Messungen hingegen zeigten einen Transport-bedingten Alterungseffekt der Proben, sodass trotz des ausreichend negativen Zetapotentials von einer eingeschränkten Stabilität ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund werden die Partikelsuspensionen in den weiteren Untersuchungen direkt nach der Herstellung und Charakterisierung durch DLS-Messungen auf Titansubstrate aufgebracht.

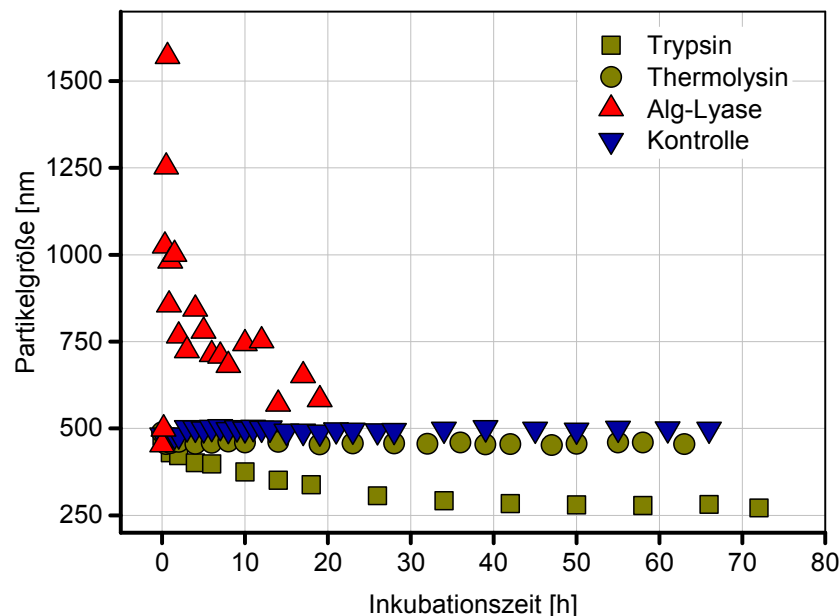


Abbildung 6—45 Stabilitätsuntersuchungen der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in PBS, Volumenverhältnis 4:1). Charakterisierung durch Dynamische Lichtstreuexperimente anhand der Partikelgrößenänderung. Die Proben wurden bei 37 °C über den gezeigten Zeitraum in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Enzym (je 2,5 μ g/mL von Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase) inkubiert.

6.3.3 Charakterisierung von Alg/NI(V)TEGE-Nanopartikeln

Die in Kapitel 6.3.2 vorgestellte Alg/ α PLL-Formulierung kann durch den Zusatz der körpereigenen Protease Trypsin degradiert werden. Als wichtiges Enzym im Verdauungstrakt wird Trypsin allerdings nicht spezifisch bei Infektionsreaktionen freigesetzt. Die Protease Aggrecanase hingegen, die beispielsweise bei pathogenen Prozessen wie Osteoarthritis vermehrt freigesetzt wird und zur Degradation von Knorpelsubstanz führt, stellt ein infektionsrelevantes Enzym dar.¹⁶⁵ Folglich musste die Peptidkomponente so angepasst

werden, dass eine spezifische Degradation der Sequenz durch Aggrecanase ablaufen kann. Wie in Kapitel 4.2.3 erwähnt, wurden durch Festphasenpeptidsynthese zwei aus 25 Aminosäuren bestehende Peptide hergestellt, die eine aggrecanase-spezifische Spaltregion besitzen. Die mit NITEGE bzw. NVTEGE bezeichneten Sequenzen sollten durch humane (NITEGE) respektive murine Aggrecanase (NVTEGE) hydrolysiert werden können. Des Weiteren wurde sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Ende mit jeweils vier Lysineinheiten versehen, die die positive Ladung für die Partikelbildung bereitstellen sollen. Die vollständigen Sequenzen sind KKKK-GRD-NITEGEARGSV-DRG-KKKK, spaltbar durch humane Aggrecanase, und KKKK-GRD-NVTEGEALGSV-DRG-KKKK, spaltbar durch murine Aggrecanase.

Zunächst wurde die Nanopartikelherstellung in Reinstwasser überprüft, indem jeweils 1 mg/mL konzentrierte Natriumalginate- und Peptidlösung in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurde. Um die in Abbildung 6–46 dargestellten, engen Partikelgrößenverteilungen zu erhalten, musste mit einem 1:1-Verhältnis gearbeitet werden. Unabhängig vom verwendeten Peptid konnten Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 143 ± 25 nm und einer niedrigen Polydispersität von $0,16 \pm 0,02$ erhalten werden. Somit sind die hergestellten Alg/NITEGE- bzw. Alg/NVTEGE-Partikel in Reinstwasser etwa halb so groß wie die Alg/ α PLL-Partikel mit einem Durchmesser von 330 ± 35 nm. Dieser Größenunterschied könnte auf die veränderte Peptidsequenz oder auf das Mischungsverhältnis der Komponenten zurückgeführt werden. Durch die Variation der Aminosäuresequenz, ausgehend von dem Homopolypeptid α PLL hin zu den NI(V)TEGE-Peptiden, werden die Ladungsverhältnisse signifikant beeinflusst. Die Anwesenheit von negativ geladenen und ungeladenen Aminosäuren wie Glutaminsäure (E) bzw. Serin (S), Glycin (G), Threonin (T) verringert die positive Ladung der Lysin-Endgruppen, die für die elektrostatische Wechselwirkung mit Alginat notwendig ist. Daher muss das Verhältnis der NI(V)TEGE-Komponente für die Partikelpräparation erhöht werden, und gegenüber dem Alg/ α PLL-System ist der Alginatanteil somit deutlich geringer.

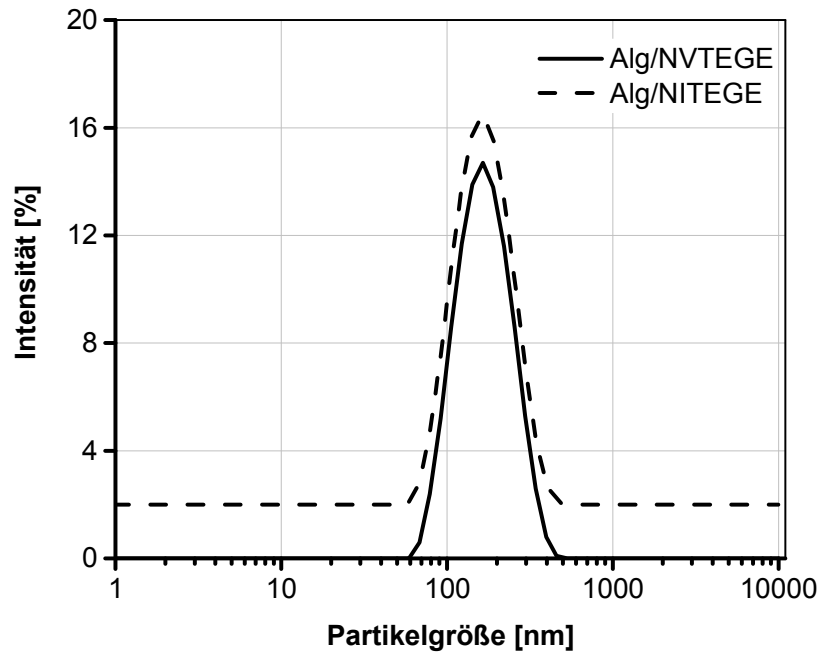


Abbildung 6—46 Partikelgrößenverteilung der Alg/NITEGE- und Alg/NVTEGE-Nanopartikel (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1). Die Partikelgrößenverteilung der Alg/NITEGE-Partikel ist der Übersichtlichkeit halber auf der y-Achse um +2 verschoben.

Die Alg/NI(V)TEGE-Nanopartikelsuspensionen wurden anschließend hinsichtlich ihres Zetapotentials untersucht, welches laut PUJALA einen Hinweis auf die Stabilität der Nanopartikel gibt.²³⁹ In Abbildung 6—47 sind die Oberflächenladungen der Alg/NITEGE- (-39 ± 1 mV) und der Alg/NVTEGE-Nanopartikel (-41 ± 1 mV) gezeigt. Die Ergebnisse verdeutlichen, übereinstimmend mit den Partikelgrößenmessungen, keine signifikanten Unterschiede der beiden Nanopartikelformulierungen. Daher wird vermutet, dass die veränderte Aminosäuresequenz des Peptidlinkers in der Partikelbildung als vernachlässigbar behandelt werden kann. Mit den Zetapotentialwerten von etwa -40 mV sollten stabile Nanopartikel gebildet werden, welche nicht zu Aggregationen neigen dürften.

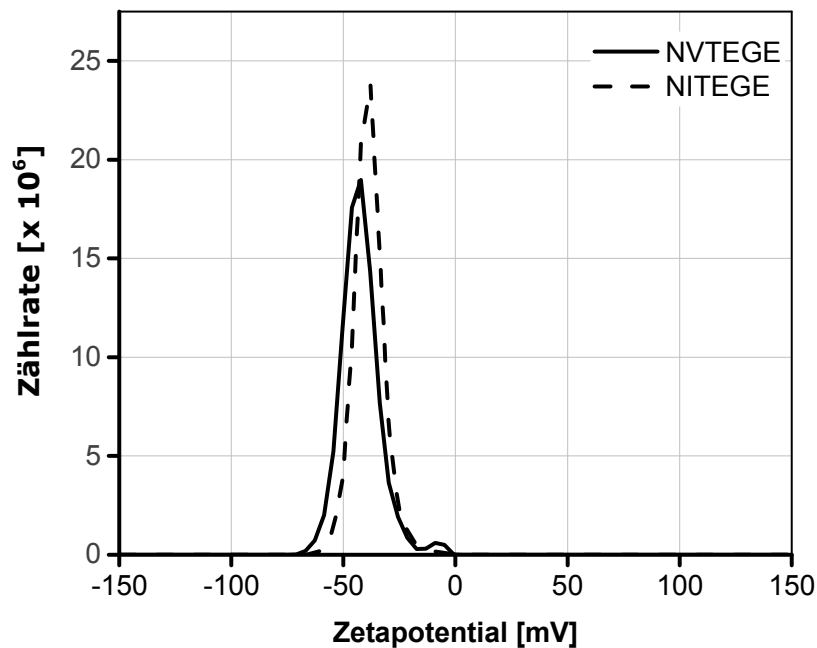


Abbildung 6—47 Zetapotential der Alg/NITEGE- und Alg/NVTEGE-Nanopartikel in Reinstwasser (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1).

Sowohl die Partikelgrößen- als auch die Zetapotentialuntersuchungen lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alg/NITEGE- und den Alg/NVTEGE-Nanopartikeln. Aus diesem Grund wurde für die weitere Charakterisierung der Systeme exemplarisch die Alg/NITEGE-Formulierung verwendet. Zunächst wurden die per DLS ermittelten Partikelgrößen mithilfe der bereits in Kapitel 6.3.2 auf Seite 126 vorgestellte NTA-Methode überprüft.^{xxvii} Analog zu den Alg/ α PLL-Partikeln wurde gemäß Abbildung 6—48 auch beim Alg/NITEGE-System ein Unterschied zwischen den NTA- (83 ± 2 nm) und den DLS-Messungen (143 ± 25 nm) festgestellt, der wie bei den Alg/ α PLL-Suspensionen auf Seite 127 wiederum auf die Auswertung der Messergebnisse zurückzuführen ist. Die Umrechnung der Intensitätsgewichteten in eine Anzahl-gewichtete Partikelgrößenverteilung liefert eine Partikelgröße von 70 ± 15 nm und lässt sich damit mit den Resultaten der NTA-Untersuchungen vergleichen. Zusätzlich konnten durch die Visualisierung der Proben bei der NTA-Methode sphärische Strukturen beobachtet werden.

^{xxvii} Durchgeführt von Dr. Rolf Nitzsche von MALVERN INSTRUMENTS im Rahmen einer Gerätevorführung.

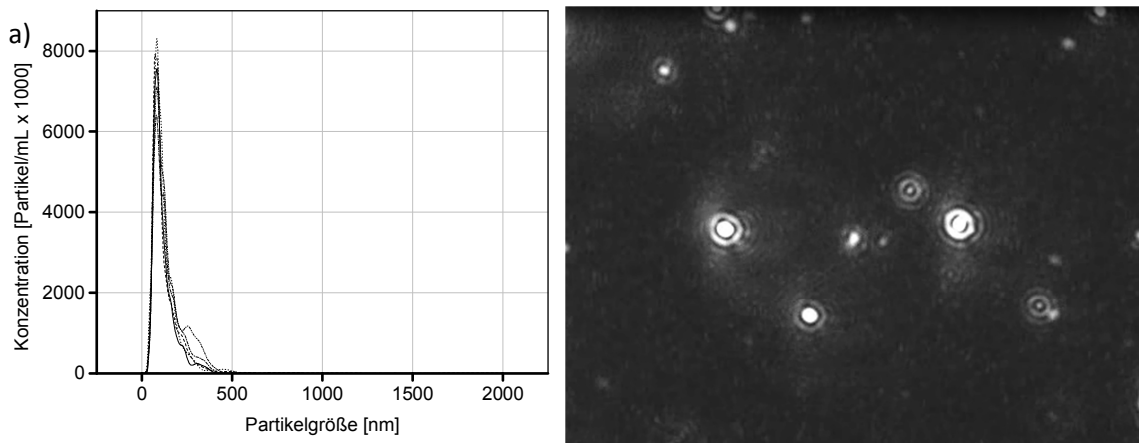


Abbildung 6—48 a) Ergebnisse der NTA-Messungen von Alg/NITEGE (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1). Die Probe wurde 1:1.000 verdünnt. b) Exemplarischer Screenshot der in a) vermessenen Probe.

Die Morphologie der Alg/NITEGE-Nanopartikel wurde auch rasterelektronenmikroskopisch evaluiert. In Analogie zu der Analyse der CS/TPP- und der Alg/ α PLL-Partikel wurden die Proben in gefrorenem Zustand mittels Kryo-REM vermessen. Gemäß Abbildung 6—49 konnten, vergleichbar zum Alg/ α PLL-System, neben sphärischen Partikeln der Größe 100 – 150 nm auch Verästelungen untereinander beobachtet werden, die wiederum auf eine Vernetzung der Partikel hindeuten könnten. Die Netzwerkbildung ist gegenüber den Alg/ α PLL-Partikeln deutlich ausgeprägter. Eine abschließende Erklärung für den beobachteten Sachverhalt konnte bislang noch nicht gefunden werden.

Der Vernetzungseffekt konnte exklusiv für die Alg/Peptid-Partikel beobachtet werden und spielte keinen Einfluss bei den zuvor analysierten CS-58/TPP- und CS-83/TPP-Formulierungen. Durch den Transport und die nicht zeitnahe Messung der Proben könnten die beobachteten Strukturen als Resultat von Alterungsprozessen interpretiert werden. Wie bereits im Kapitel 6.3.2 erwähnt, könnten in einer sich dem Herstellungsprozess direkt anschließenden Charakterisierung, ähnlich wie bei den NTA-Messungen, einzelne, unvernetzte Partikel zeigen.

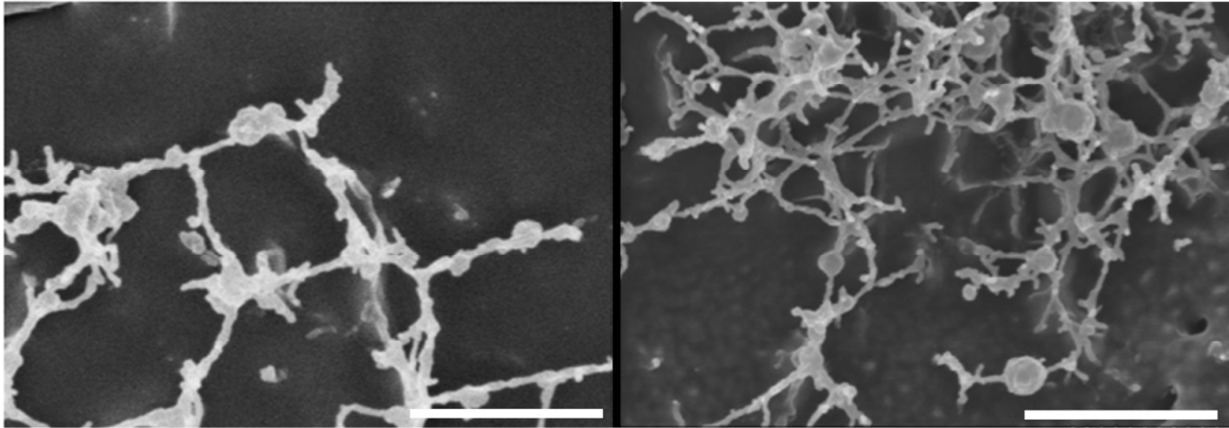


Abbildung 6—49 Kryo-REM-Aufnahmen der Alg/NITEGE-Nanopartikel in Reinstwasser (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 500 nm.

Um die Lagerungsstabilität der Alg/NITEGE-Partikel näher zu untersuchen, wurden die in Abbildung 6—50 illustrierten Langzeitmessungen in Reinstwasser bei 37 °C durchgeführt. Dabei wurde neben der Evaluierung der Beständigkeit der Proben ohne Enzymzugabe auch das Verhalten in Gegenwart von Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase untersucht. Aufgrund der sich kaum verändernden Partikelgrößen ohne Enzymzugabe wurde eine ausreichende Stabilität der Alg/NITEGE-Partikel über den betrachteten Zeitraum von 60 Stunden festgestellt. Demgegenüber bedingt die Zugabe von 2,5 µg/mL konzentrierten Enzymlösungen von Trypsin und Thermolysin einen spontanen Anstieg der hydrodynamischen Durchmesser von etwa 130 nm auf einen Endwert von jeweils ungefähr 280 – 300 nm. Der Anstieg der Partikelgröße ist für Trypsin gegenüber Thermolysin deutlich beschleunigt. Bereits nach fünf Stunden erreicht der hydrodynamische Durchmesser für Trypsin einen Maximalwert von etwa 300 nm, der bis zum Ende des Experiments bei 67 Stunden keine Veränderung erfährt. Im Vergleich dazu steigt die Partikelgröße für Thermolysin langsamer an und erreicht erst nach circa 20 Stunden ein Plateau bei 280 nm. Lediglich die Geschwindigkeit der Partikelgrößenzunahme wird daher direkt vom verwendeten Enzym beeinflusst, während das Ausmaß der Partikelgrößenänderungen im Rahmen der Messgenauigkeit der DLS übereinstimmt. Als Grund für dieses Verhalten wird die Spezifität der beiden Enzyme angeführt. Die Aggrecanase-labile NITEGE-Sequenz besitzt wesentlich mehr Spaltstellen für Trypsin (10) als für Thermolysin (2). Daher sollte der Einfluss von Trypsin auf die Geschwindigkeit der Degradation und damit auf die Partikelgrößen gravierender sein. Allerdings wird im Gegensatz zu der Degradation des Alg/αPLL-Systems keine Abnahme, sondern ein Anstieg der hydrodynamischen Durchmesser festgestellt. Diese Partikelgrößenzunahme könnte einerseits mit der Reintegration von hydrolysierten

Peptidfragmenten in die Nanopartikel oder durch elektrostatische Effekte erklärt werden. Die Zunahme der Partikelgröße als Folge enzymatischer Degradation wurde bereits von McDONALD et al. und THORNTON et al. beschrieben. Sie vermuten eine elektrostatische Abstoßung zwischen den protonierten Lysinresten in der Sequenz und den Aminogruppen, die nach der Spaltung entstehen.²⁴⁰ Zusätzlich könnte durch die Generierung von Spaltstellen die Solvatisierung der Nanopartikel durch Wassermoleküle vereinfacht sein, in deren Folge ein quellungsähnliches Verhalten beobachtet werden könnte. Die in Gegenwart von Trypsin und Thermolysin beobachteten, gleichbleibenden Partikelgrößen könnten dadurch erklärt werden, dass die Erreichbarkeit der Spaltstellen durch die Proteasen, aufgrund der sich ständig verändernden Zusammensetzung der Nanopartikeloberfläche, eingeschränkt ist. Nach einer gewissen Inkubationszeit kommt die Degradation dann vollständig zum Erliegen und resultiert in keiner weiteren Änderung der Partikelgröße. Auch für Alginate-Lyase wurde ein Anstieg der Partikelgrößen beobachtet, der im Vergleich zur Degradation der Alg/ α PLL-Formulierung linear ist und deutlich langsamer abläuft. Nach über 100 h Inkubationszeit kann wiederum eine Präzipitation beobachtet werden, die auf eine Aggregation der Spaltfragmente hindeutet. Die Reduktion der Geschwindigkeit gegenüber dem Alg/ α PLL-System kann vermutlich auf die niedrigere Konzentration von Alginate in der Nanopartikelsuspension zurückgeführt werden.

Aus den Messungen kann eine Veränderung der Partikelgrößen infolge der Zugabe der Enzymlösungen festgestellt werden, die auf eine Degradation hinweist. Aus den Experimenten lässt sich eine enzymatische Responsivität in Anwesenheit von Trypsin und Thermolysin ableiten. Weitere Degradationen müssten jedoch in Gegenwart der Aggrecanase durchgeführt werden, um letztlich eine infektionsrelevante Protease in den Degradationsverlauf einzubeziehen.

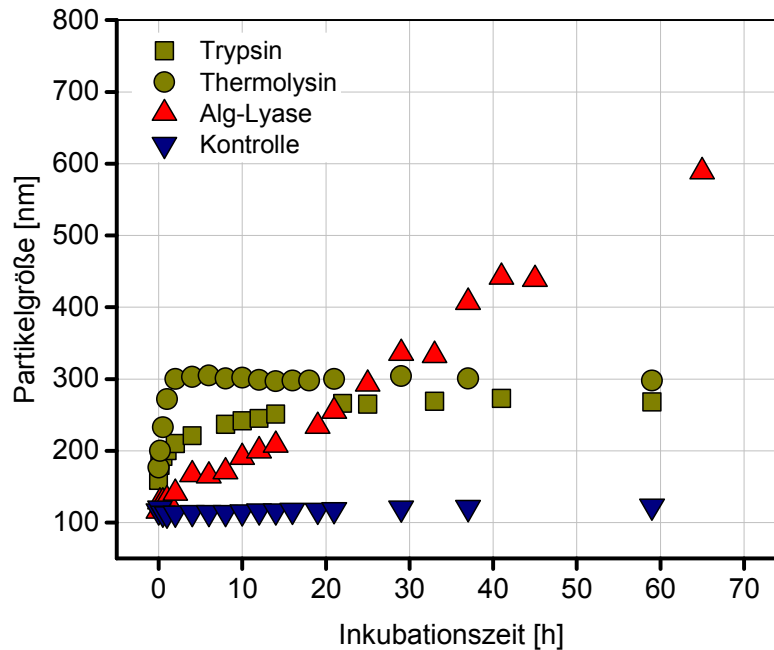


Abbildung 6—50 Stabilitätsuntersuchungen der Alg/NITEGE-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1). Charakterisierung durch Dynamische Lichtstreuexperimente anhand der Partikelgrößenänderung. Die Proben wurden bei 37 °C über den gezeigten Zeitraum in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von Enzym (je 2,5 µg/mL von Trypsin, Thermolysin und Alginatlyase) inkubiert.

6.3.4 Alg/Peptid-Nanopartikel als Beschichtung auf Titan

Für den potentiellen Einsatz der Materialien in Kapitel 6.3.2 und 6.3.3 als Implantatbeschichtung muss die Adhäsion der Partikel auf Titan getestet werden. Im Anschluss an die Präparation und die Charakterisierung der Suspensionen durch Dynamische Lichtstreuemessungen wurden die Nanopartikelformulierungen zeitnah auf Titansubstrate aufgesprüht. Durch die Abstoßung zwischen der negativen Oberflächenladung der Alg/ α PLL-Partikel und der negativen Titanoberfläche konnte in diesem Fall keine zufriedenstellende Adsorption erreicht werden. Die auf diese Weise immobilisierten Schichten lassen sich zwar nachweisen, aufgrund der mangelnden Wechselwirkung zwischen Nanopartikel und Substrat sind die Beschichtungen jedoch nicht stabil und überstehen den Waschschriff nicht. Daher wurde auf die verwendeten Titansubstrate in einem einminütigen Tauchprozess mit einer 5 % (w/w) Polyethyleniminlösung (PEI) eine positiv geladene Grundschrift aufgebracht, welche laut ellipsometrischer Auswertung eine Schichtdicke von ungefähr 3 ± 1 nm aufweist. In Abbildung 6—51 sind die ellipsometrisch ermittelten Schichtdicken der Alg/ α PLL- und der Alg/NITEGE-Beschichtungen von jeweils 5 Titansubstraten (TiAl6V4) aus Reinstwasser veranschaulicht. Die angesprochene PEI-Grundschrift konnte in einem dreiminütigen Sprühprozess (etwa 20 µL) mit etwa 77 ± 4 nm der 1 mg/mL-konzentrierten Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspension versehen werden. Eine analoge Beschichtung mit den Alg/NITEGE-

Nanopartikeln führte zu Schichtdicken von 55 ± 5 nm. Der deutliche Unterschied von 25 nm zwischen den Alg/Peptid-Nanopartikelbeschichtungen könnte aus der unterschiedlichen Löslichkeit der Formulierungen in Wasser resultieren. Durch den Waschschriff nach der Beschichtung könnten die besser löslichen Alg/NITEGE-Partikel partiell von der Oberfläche entfernt werden. Trotz der Unterschiede in den gemessenen Schichtdicken können beide Alg/Peptid-Nanopartikel auf Titan Schichten ausbilden.

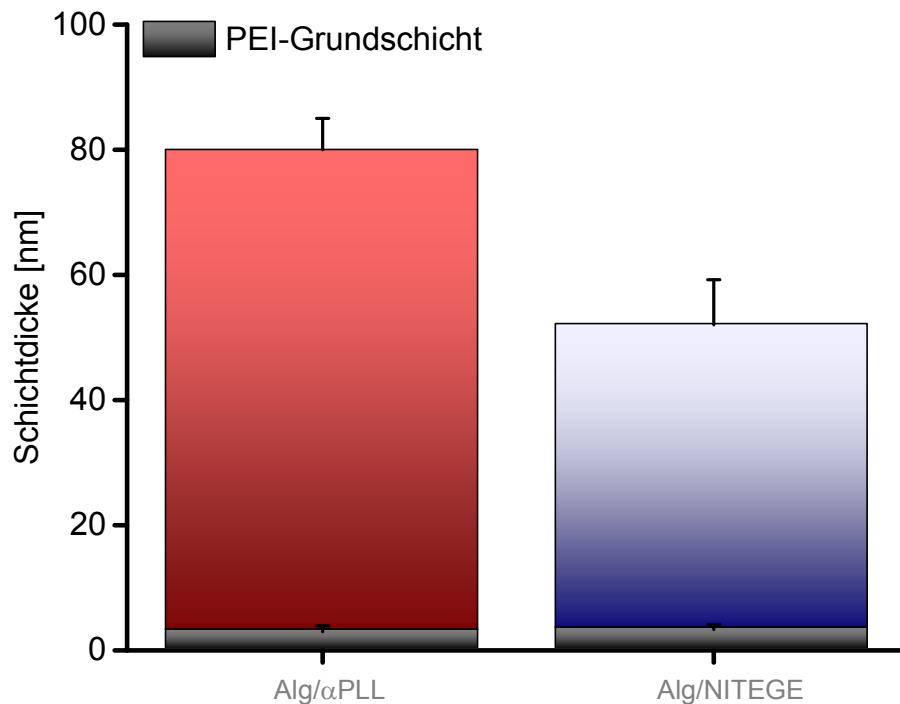


Abbildung 6—51 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Alg/αPLL- (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) und der Alg/NITEGE-Beschichtung (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1) mit PEI-Grundschrift. Die TiAl6V4-Substrate wurden mit der PEI-Grundschrift (5 % w/w) in einem einminütigen Tauchprozess beschichtet, bevor eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 µL) mit den Alg/Peptid-Nanopartikeln erfolgte. Vor den ellipsometrischen Messungen wurden die Plättchen in Reinstwasser gewaschen. n = 5.

Die Abscheidung der Alginat/Peptid-Nanopartikel auf der PEI-Grundschrift wurde zusätzlich durch die Verwendung der Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS) überprüft, die in Kapitel 5.3 vorgestellt wurde. Bei dieser Messanordnung wird der Infrarotstrahl bei „streifenden Einfall“ an der Probenoberfläche reflektiert und die Änderung der Absorption detektiert.^{183,184}

Das Alginat/αPLL-System wurde untersucht, indem neben den Nanopartikeln auch Beschichtungen der Einzelkomponenten αPLL und Natriumalginat auf TiAl6V4 durchgeführt wurden. Die in Abbildung 6—52 dargestellten RAIRS-FTIR-Spektren der beschichteten

Substrate zeigen den relevanten Wellenzahlbereich von $2.050 - 900 \text{ cm}^{-1}$,^{xxviii} der die erfolgreiche Abscheidung der Komponenten bestätigt. Im α PLL-Spektrum fallen die markanten Signale bei 1.671 und 1.547 cm^{-1} auf, welche auf Beugeschwingungen der Amid I- und Amid II-Bande hindeuten.²⁴¹ Die intensivsten Banden im FTIR-Spektrum von Alginat liegen bei 1.622 , 1.414 sowie 1.097 cm^{-1} und können eindeutig asymmetrischen (1.622 cm^{-1}) und symmetrischen Carboxylstreckschwingungen (1.414 cm^{-1}) zugeordnet werden. Die Bande bei 1.097 cm^{-1} lässt sich mit der Streckschwingung der OH-Gruppen im Polymer erklären.²⁴² Das FTIR-Spektrum der Alginat/ α PLL-Nanopartikelbeschichtung kann als Summe der Spektren von α PLL und von Alginat verstanden werden kann. Dadurch konnte die erfolgreiche Abscheidung der Nanopartikel auf der Titanlegierung bewiesen werden.

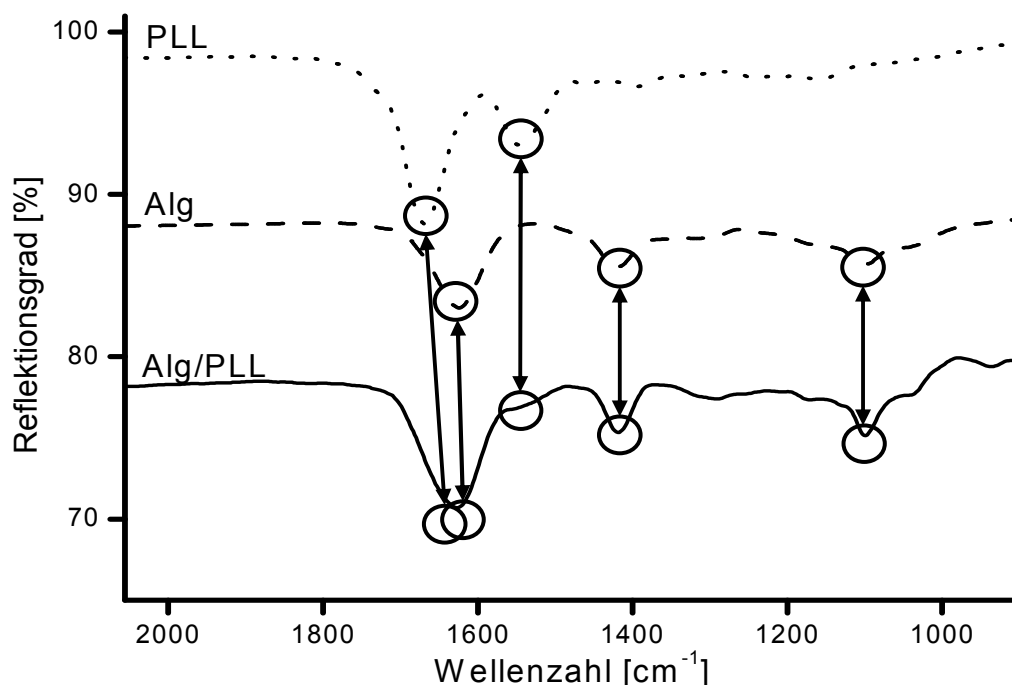


Abbildung 6—52 RAIRS-Spektren der Komponenten α PLL und Alginat sowie der Alginat/ α PLL-Nanopartikel auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/ α PLL-Nanopartikel 4:1). Dargestellt ist ein Ausschnitt von $2.050 - 900 \text{ cm}^{-1}$.

Analoge RAIRS-FTIR-Untersuchungen wurden mit der Alginat/NITEGE-Nanopartikelbeschichtung durchgeführt (siehe Abbildung 6—53). Aus dem NITEGE-Spektrum von $2.100 - 950 \text{ cm}^{-1}$ können die Banden bei 1.671 und 1.547 cm^{-1} wiederum als Amid I- und Amid II-Schwingungen identifiziert werden.^{xxix} Das Signal bei 1.205 cm^{-1} resultiert vermutlich aus C-N-Streckschwingungen bzw. N-H-Deformationsschwingungen und wird als Amid III-

^{xxviii} Das vollständige Spektrum von $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ befindet sich in Anhang 10-45.

^{xxix} Das vollständige Spektrum von $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ befindet sich in Anhang 10-46.

Bande bezeichnet.²⁴³ Aufgrund der komplexen Peptidsequenz konnte die Bande bei 1.133 cm^{-1} nicht mit ausreichender Sicherheit zugeordnet werden.

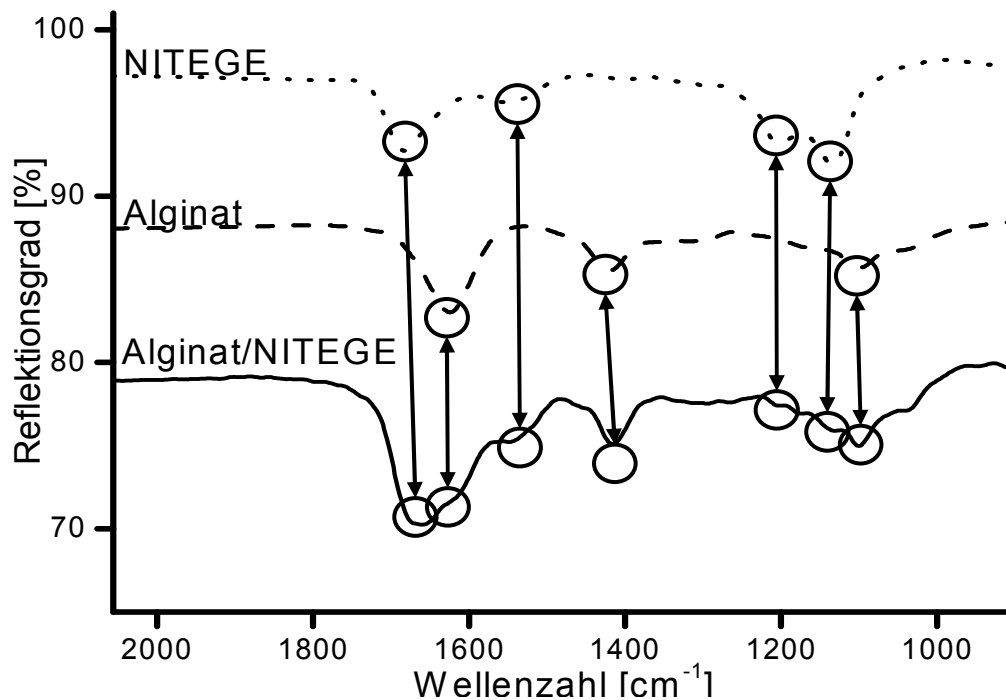


Abbildung 6—53 RAIRS-Spektren der Komponenten NITEGE und Alginat sowie der Alginat/NITEGE-Nanopartikel auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/NITEGE-Nanopartikel 1:1). Dargestellt ist ein Ausschnitt von $2.050 - 900\text{ cm}^{-1}$.

Mit rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sollte eruiert werden, ob die Materialien infolge des Sprühprozesses weiterhin als sphärische Nanopartikel vorliegen.^{xxx} Für sämtliche REM-Untersuchungen wurde bewusst auf die isolierende PEI-Grundsicht verzichtet, die eine Messung ohne Besputtern der Probe unmöglich gemacht hätte. In Abbildung 6—54 ist eine 1.000-fache Vergrößerung eines TiAl6V4-Substrats dargestellt, welches mit einer Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspension teilbeschichtet wurde. Die Grenzfläche zwischen der beschichteten Seite (oben) und der unbeschichteten Seite (unten) des TiAl6V4-Plättchens ist deutlich in der Mitte des Ausschnitts zu erkennen. Auffällig sind die weißen kristallartigen Strukturen, die in großer Anzahl auf der beschichteten Seite beobachtet werden können. Dieser Befund weist auf die Anwesenheit von Salzen hin, die ohne die PEI-Schicht und dem damit verbundenen fehlenden Waschschriff nicht entfernt wurden. Aufgrund der Nanopartikelpräparation aus Natriumalginat und α -Poly-L-Lysin Hydrochlorid findet vermutlich eine Abscheidung von Natriumchlorid auf der Oberfläche statt.

^{xxx} Sämtliche REM-Untersuchungen wurden zusammen mit Herrn Peter Pfeiffer am Institut für Werkstoffe der TU Braunschweig durchgeführt.

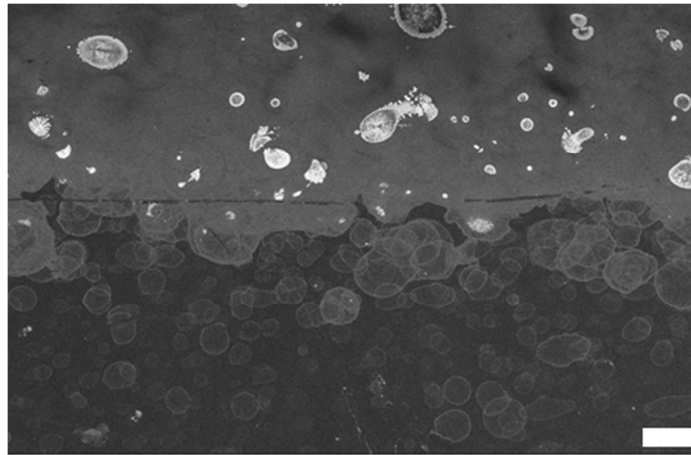


Abbildung 6—54 REM-Aufnahme (1.000-fach vergrößert) des Übergangs einer teilbeschichteten Alg/αPLL-Probe auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/αPLL-Nanopartikel 4:1). Es erfolgte eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 µL). Die beschichtete Seite befindet sich im Ausschnitt „oben“. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Vergrößerung der beschichteten Substratseite in Abbildung 6—55 verdeutlicht neben der zuvor angesprochenen Salzkristallbildung auch die Homogenität der Beschichtung. Während der Messung konnten keine einzelnen Partikel aufgelöst werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Nanopartikel infolge des Sprühprozesses in einen ionisch vernetzten Film umlagern, der auf der Oberfläche haftet.

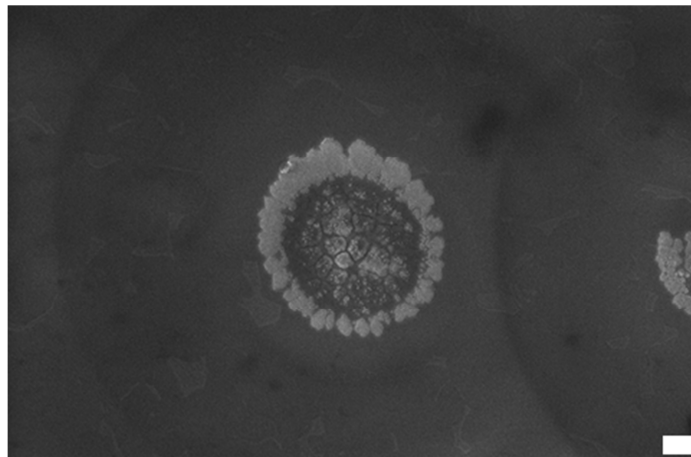


Abbildung 6—55 REM-Aufnahme (10.000-fach vergrößert) der beschichteten Seite einer Alg/αPLL-Probe auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/αPLL-Nanopartikel 4:1). Es erfolgte eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 µL). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 1 µm.

Die REM-Untersuchung eines mit Alg/NITEGE-Nanopartikeln teilbeschichteten TiAl6V4-Substrats ist in Abbildung 6—56 dargestellt. Der Übergang von beschichteter (oben) zu unbeschichteter (unten) Seite ist auch hier klar zu erkennen. Gegenüber der Alg/αPLL-Beschichtung können hier allerdings zwei Unterschiede festgestellt werden. Die Beschichtung erscheint einerseits durch die „wolkenartige“ Textur inhomogener, da zwischen den grauen Flächen einzelne schwarze Stellen zu erkennen sind. Dieser Befund würde für die niedrigeren Schichtdicken sprechen, wie sie ellipsometrisch bestimmt wurden

(Abbildung 6—51). Andererseits werden auf der Alg/NITEGE-Beschichtung keine Salzkristalle auf der Oberfläche beobachtet. Für das Peptid mit der NITEGE-Sequenz werden Trifluoressigsäure-Ionen als Gegenionen für die Lysineinheiten verwendet und nicht Chlorid-Ionen wie beim α PLL.

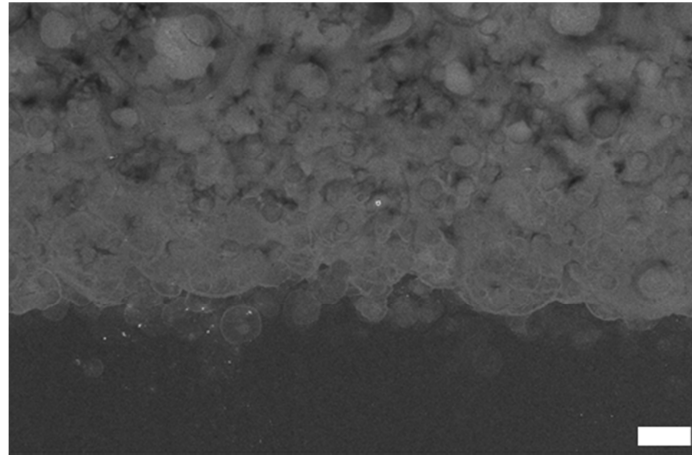


Abbildung 6—56 REM-Aufnahme (1.000-fach vergrößert) des Übergangs einer teilbeschichteten Alg/NITEGE-Probe auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/NITEGE-Nanopartikel 1:1). Es erfolgte eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 μ L). Die beschichtete Seite befindet sich im Ausschnitt „oben“. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Bei genauerer Betrachtung der 10.000-fachen Vergrößerung der beschichteten Seite der Alg/NITEGE-Probe in Abbildung 6—57 können, ähnlich wie in Abbildung 6—55, keine nanopartikulären Strukturen beobachtet werden. Wiederum muss davon ausgegangen werden, dass sich die sphärischen Partikel beim Sprühprozess in einen ionisch vernetzten Film umorganisieren. Als Erklärung für die Umlagerung muss zunächst das Zetapotential der Alg/Peptid-Nanopartikel herangezogen werden. Mit den hohen negativen Zetapotentialen von -48 mV (Alg/ α PLL) und -41 mV (Alg/NITEGE) sollte laut PUJALA et al. eine hohe Stabilität der Materialien erwartet werden.²³⁹ Bedingt durch den Sprühprozess und der damit verbundenen Evaporation des Lösungsmittels ist eine Aggregation beziehungsweise Koaleszenz der Partikel hingegen sehr wahrscheinlich.

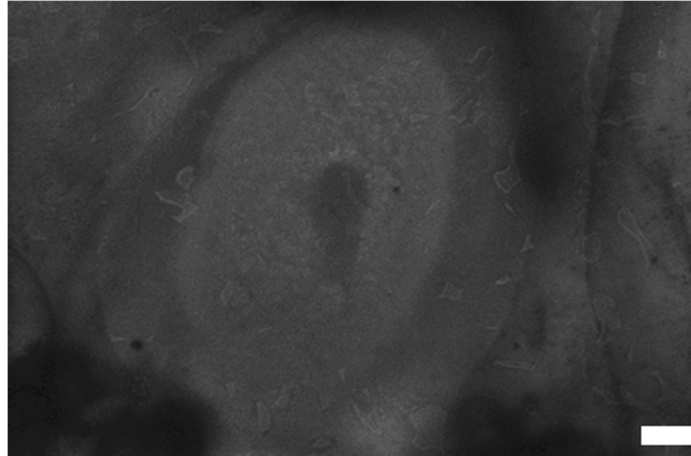


Abbildung 6—57 REM-Aufnahme (10.000-fach vergrößert) der beschichteten Seite einer Alg/NITEGE-Probe auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/NITEGE-Nanopartikel 4:1). Es erfolgte eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 μ L). Der weiße Maßstabsbalken entspricht 2 μ m.

Zur weiteren Analyse der Beschichtungen wurden die Substrate mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy - XPS) charakterisiert. Diese Methode erlaubt die Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der Alg/Peptid-Beschichtungen. Die entsprechenden Oberflächenzusammensetzungen der Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Schichten sind neben der TiAlV6-Kontrolle in Abbildung 6—58 dargestellt. Die Auswertung zeigt für das unbeschichtete Substrat hohe atomare Konzentrationen von Titan (18 %) und Sauerstoff (54 %), die auf die Existenz von passivierenden Titanoxiden auf der Oberfläche hindeuten. Der Nachweis von Aluminium resultiert aus der Verwendung der TiAl6V4-Legierung. Zusätzlich lassen sich hohe Konzentrationen an Kohlenstoff (23 %) detektieren, welche neben Stickstoff (< 1 %) als Kontaminationen betrachtet werden können. Auf den mit Alg/Peptid-Nanopartikeln beschichteten TiAl6V4-Substraten hingegen sind die atomaren Konzentrationen von Titan (0 %) und Sauerstoff (26 %) deutlich verringert, während der Kohlenstoff- (62 %) und der Stickstoffgehalt (zwischen 9 und 12 %) zunimmt. Diese Beobachtung geht einher mit der erfolgreichen Abscheidung der Nanopartikel auf der Oberfläche. Durch die Beschichtung findet eine Bedeckung der Oberfläche statt, und die Titanoxide können nicht mehr detektiert werden. Mit einer Eindringtiefe von etwa 10 nm des XPS kann deshalb geschlossen werden, dass die Schichtdicken deutlich höher sein müssen. Der signifikante Anstieg der Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentrationen gibt einen weiteren Hinweis auf eine erfolgreiche Beschichtung. Die hohen Stickstoffgehalte resultieren hierbei aus den verwendeten Peptidkomponenten α PLL und NITEGE. Der Vergleich der beiden

Nanopartikelbeschichtungen zeigt jedoch keine wesentlichen Unterschiede, da sich die atomaren Verhältnisse stark ähneln.

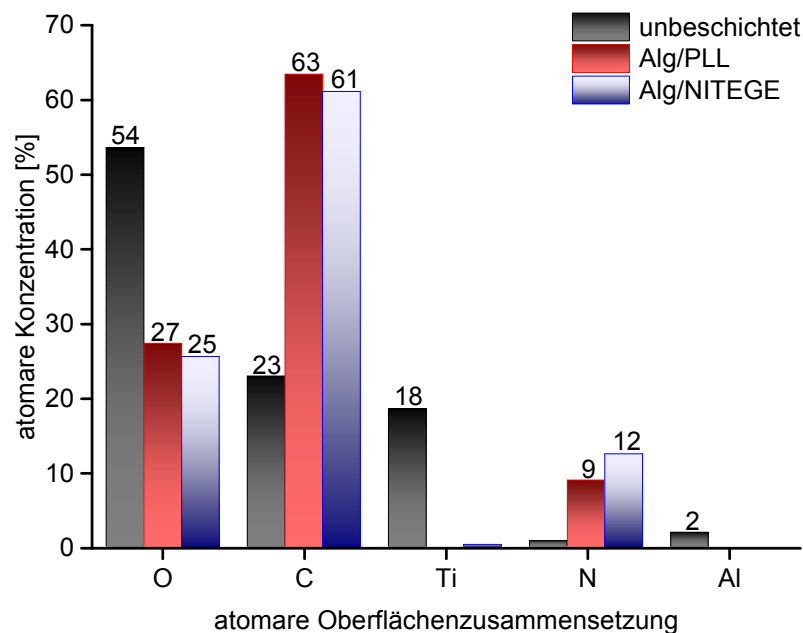


Abbildung 6—58 Bestimmung der atomaren Oberflächenzusammensetzung von zwei mit Alg/ α PLL- (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) und Alg/NITEGE-Nanopartikeln (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1) beschichteten TiAl6V4-Substrate mittels XPS im Vergleich zu einem unbeschichteten Titanplättchen. TiAl6V4-Substrate wurden mit der PEI-Grundsicht (5 % w/w) in einem einminütigen Tauchprozess beschichtet, bevor eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 μ L) mit den Alg/Peptid-Nanopartikeln erfolgte.

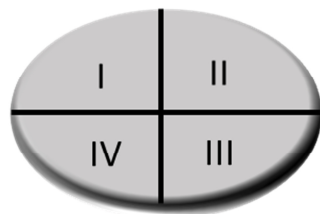
In Tabelle 6-7 sind die theoretischen und die experimentell bestimmten atomaren Konzentrationen der Beschichtungen zusammengefasst. Hierbei fällt auf, dass vor allem die berechneten Werte für die Kohlenstoffkonzentrationen von 47 % bei den Alg/ α PLL- und 53 % bei den Alg/NITEGE-Nanopartikeln signifikant von den berechneten Konzentrationen von über 60 % abweicht. Dieser Sachverhalt könnte mit Kohlenstoffverunreinigungen erklärt werden, die sich aus der Luft auf der Oberfläche abscheiden. Die experimentell ermittelten Konzentrationen von Sauerstoff und Stickstoff (27 % und 9 % für Alg/ α PLL sowie 25 % und 12 %) sind mit den theoretisch erwarteten Werten vergleichbar und deuten auf eine erfolgreiche Immobilisierung der Nanopartikel hin. Die Berechnung des Kohlenstoff- zu Stickstoffverhältnisses (C/N-Verhältnis) lieferte $C/N = 7$ für Alg/ α PLL und $C/N = 5,1$ für Alg/NITEGE, die sich direkt mit den berechneten Werten von $C/N = 9,4$ respektive $C/N = 4,4$ in Einklang bringen lassen.

Tabelle 6-7

Theoretisch berechnete und mittels XPS experimentell bestimmte atomare Konzentrationen von Sauerstoff O, Kohlenstoff C und Stickstoff N der Nanopartikelbeschichtungen aus Alg/ α PLL (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) und Alg/NITEGE (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1). Bei den Berechnungen wurde der Anteil von Wasserstoff nicht berücksichtigt. Zusätzlich ist das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis (C/N-Verhältnis) angegeben.

	Alg/ α PLL		Alg/NITEGE	
	theoretisch	experimentell	theoretisch	experimentell
Sauerstoff O	33 %	27 %	28 %	25 %
Kohlenstoff C	47 %	63 %	53 %	61 %
Stickstoff N	5 %	9 %	12 %	12 %
C/N-Verhältnis	9,4	7	4,4	5,1

Des Weiteren wurden die beschichteten Substrate mit FlugzeitSekundärionenmassenspektrometrie (time-of-flight secondary ion mass spectrometry – ToF-SIMS) analysiert.^{xxxii} Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit Primärionen wie beispielsweise Bi^+ , Bi^{2+} , Bi^{3+} , CS^+ oder C_{60}^+ von bis zu 30 keV bestrahlt. Die aus der Oberfläche herausgelösten Sekundärionen können anschließend entsprechend ihrer Masse detektiert werden.²⁴⁴ Mit dieser Technik können Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Alg/Peptid-Nanopartikelbeschichtungen gezogen werden. Für die Probenpräparation wurden polierte Reintitansubstrate in Quadranten eingeteilt (siehe Abbildung 6—59). Jeder dieser vier Quadranten wurde in der Folge mit einer anderen Beschichtung versehen, sodass auf einem Plättchen neben dem polierten Titan, auch die PEI-Grundschrift und die Alg/Peptid-Nanopartikelbeschichtung (mit und ohne Interferon- β) untersucht werden konnte.



- I poliertes Titan
- II PEI-Grundschrift
- III Alg/Peptid-Nanopartikel
- IV Alg/Peptid-Nanopartikel + IFN

Abbildung 6—59 Schema der Quadranteneinteilung für die Untersuchungen der Alg/Peptid-Beschichtungen mittels ToF-SIMS (auf Reintitan).

Die Ergebnisse der Analysen sind für die Alg/ α PLL-Beschichtung anhand der Spektren in Abbildung 6—60 exemplarisch dargestellt, die das m/z-Verhältnis der positiven Ionen bis m/z = 230 wiedergeben. Auf dem unbeschichteten Titansubstrat im Quadrant I lassen sich

^{xxxii} Die ToF-SIMS-Analysen wurden von der Firma ION-TOF durchgeführt.

neben Titanionen auch Verunreinigungen wie Natrium-, Calcium- und Siliziumionen detektieren. Zusätzlich wurden kationische Kohlenwasserstoffverbindungen beobachtet, die als weitere Kontaminationen eingestuft werden können. Bei der Betrachtung des mit PEI beschichteten Quadranten II bestätigen stickstoffhaltige Verbindungen mit m/z -Werten von 28^+ (CH_2N^+), 30^+ (CH_4N^+), 42^+ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+$), 44^+ ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$), 54^+ ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^+$) und 56^+ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+$) die Abscheidung der Grundsicht.

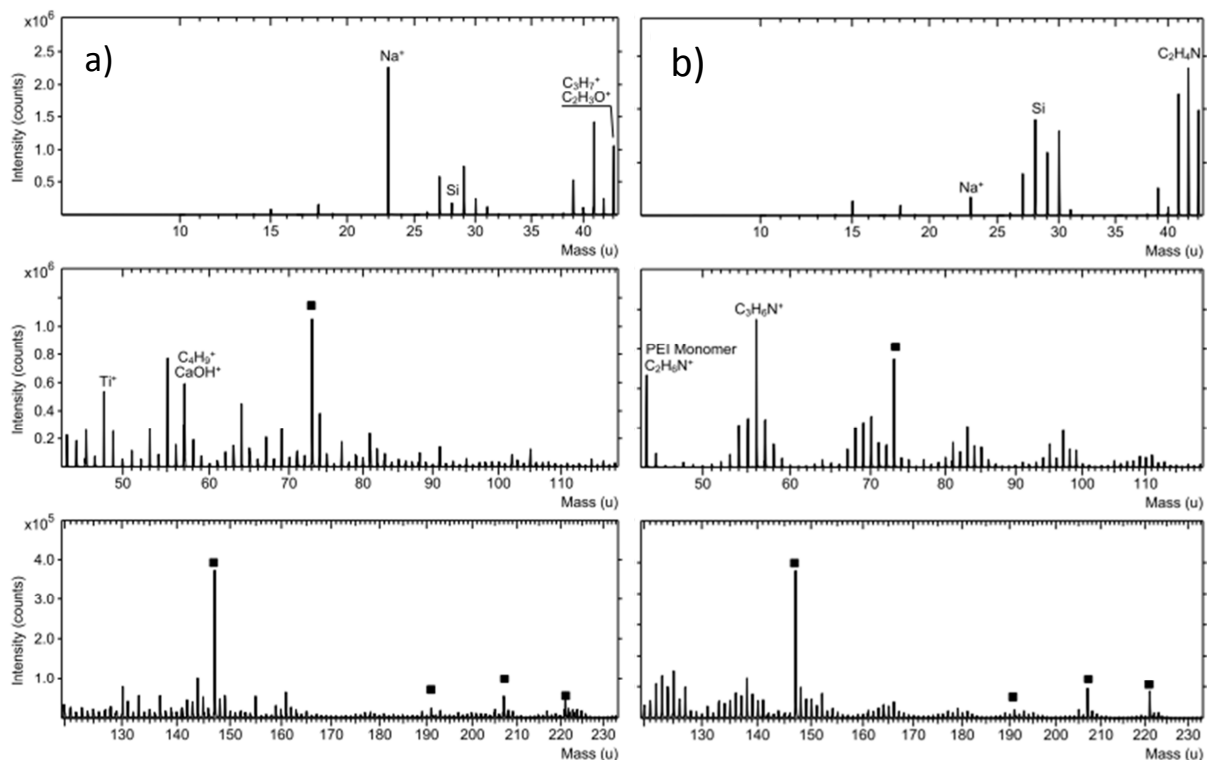


Abbildung 6—60 ToF-SIMS-Spektren der Quadranten a) I und b) II (mit PEI-Beschichtung). Dargestellt sind die Spektren der positiv polarisierten Ionen bis $m/z = 230$. Die schwarzen Quadrate sind Artefakte von Polydimethylsiloxan-Verunreinigungen.

Die anschließende Untersuchung des Quadranten III sollte Hinweise auf die Alg/ α PLL-Nanopartikelbeschichtung liefern. Neben den Signalen der Salzkontaminationen und der PEI-Grundbeschichtung wurden α PLL-spezifische m/z -Werte beobachtet. Hierbei konnten im positiv polarisierten Spektrum in Abbildung 6—61 die folgenden m/z -Werte: 18^+ (NH^+), 30^+ ($\text{CH}_2=\text{NH}_2^+$) und 84^+ ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}^+$) eindeutig zugeordnet werden.²⁴⁵ $m/z = 30^+$ wurde bereits in Abbildung 6—60a als CH_4N^+ -Artefakt von PEI identifiziert. Da sich die Signale in ihrer Intensität jedoch bedeutend unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Signal in Quadrant II aus der Abscheidung von α PLL resultiert. In dem im Anhang 10-8 gezeigten negativ polarisierten Spektrum wurden zudem noch die m/z -Werte 26^- (CN^-), 42^- (CNO^-) und 58^- ($\text{CH}_2\text{CONH}_2^-$) detektiert, die auf α PLL hindeuten.²⁴⁵ Aufgrund der Beschichtung der Nanopartikel sollten im Quadranten III theoretisch auch Signale des

Alginats beobachtet werden können. Es konnten in Abbildung 6—61 keine spezifischen Sekundärionen von Alginat beobachtet werden. Eine Aufnahme eines Spektrums des Polysaccharids wäre ratsam, um das Fragmentierungsmuster mit den Analysen der Nanopartikelbeschichtung vergleichen zu können. Analog verhält es sich mit der Beschichtung „Alg/ α PLL + IFN β “ im Quadranten IV, von der wiederum lediglich das α PLL eindeutig detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wie oben besprochen wäre die Erstellung von Vergleichsspektren der reinen Beschichtungskomponenten ratsam. Dies war nicht möglich, da die Messungen im Rahmen einer Gerätevorführung durchgeführt wurden. Des Weiteren könnte hinsichtlich des IFN β die verwendete Konzentration zu gering sein, um einen Einfluss im Massenspektrum beobachten zu können.

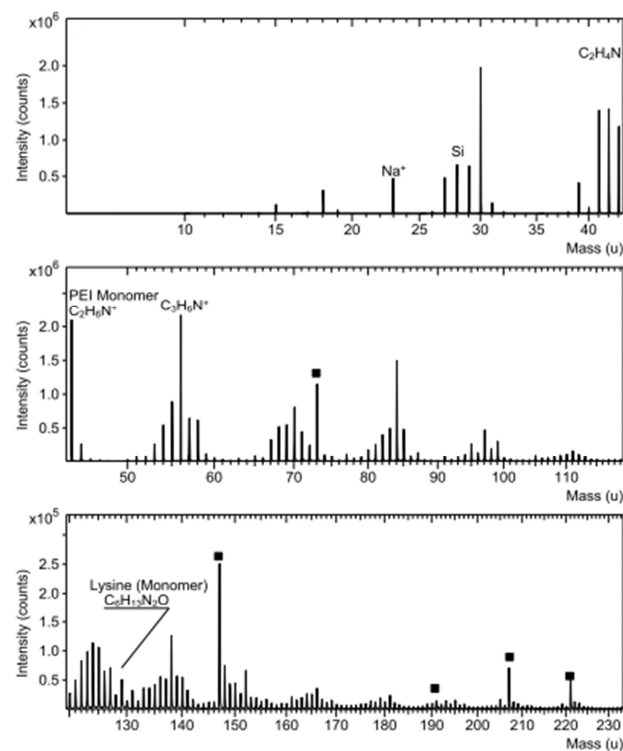


Abbildung 6—61 ToF-SIMS-Spektrum des Quadranten III mit Alginat/ α PLL. Dargestellt sind die Spektren der positiv polarisierten Ionen bis $m/z = 230$.

Es wurden Inkubationsexperimente bei 37 °C durchgeführt, um die Stabilität der Beschichtungen sowohl in Reinstwasser als Kontrolle als auch in Gegenwart 2,5 mg/mL konzentrierter Enzym Lösungen von Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase zu untersuchen. Dafür wurden jeweils 3 Titansubstrate (TiAl6V4) mit einer PEI-Grundschrift versehen, bevor die Alg/Peptid-Nanopartikel in einem dreiminütigen Sprühprozess aufgebracht wurden. In Abbildung 6—62 ist die ellipsometrische Auswertung der Inkubation der Alg/ α PLL-Nanopartikelbeschichtungen gezeigt. Die Kontrollsubstrate in Reinstwasser zeigten im Verlauf der Inkubation von 122 h keine signifikante Änderung der initialen Schichtdicke von

etwa 80 nm. Ein vergleichbarer Verlauf konnte in Anwesenheit von Thermolysin beobachtet werden, der für eine Stabilität der Beschichtung gegenüber diesem Enzym spricht. Bei den Inkubationen in Trypsin und Alginat-Lyase hingegen kann eine Abnahme der Schichtdicke der Alg/ α PLL-Beschichtungen mit zunehmender Inkubationszeit beobachtet werden. Für Trypsin kann eine Schichtdickenverringerung, ausgehend von initialen 80 nm um etwa 20 nm über einen Gesamtzeitraum von 122 h, beobachtet werden. Die finale Schichtdicke von 60 nm wird dabei bereits nach fünf Stunden erreicht und stagniert auf einem Plateau. Im Gegensatz dazu ist die Schichtdickenabnahme in Gegenwart der Alginat-Lyase von etwa 60 nm auf 20 nm deutlich ausgeprägter und wird auch bereits nach den ersten fünf Stunden Inkubationszeit erreicht. Letztlich kann über die enzymatisch bedingte Schichtdickenabnahme die mittels Dynamischer Lichtstreuung vermutete Degradation der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspension aus Abbildung 6—45 bestätigt werden. Die Alg/ α PLL-Nanopartikel und ihre Beschichtungen weisen eine ausreichende Stabilität in Reinstwasser und in Thermolysinlösungen auf. Demgegenüber lassen sich die Beschichtungen durch die Verwendung von Trypsin und Alginat-Lyase degradieren, da diese beiden Proteasen im Gegensatz zu Thermolysin eine Komponente der Nanopartikel hydrolysieren können. Dabei ist die Degradation infolge der Inkubation in Alginat-Lyase vergleichsweise gravierender, da durch die Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung des Alginats größere Bruchstücke entstehen, die von der Oberfläche abgetragen werden können.

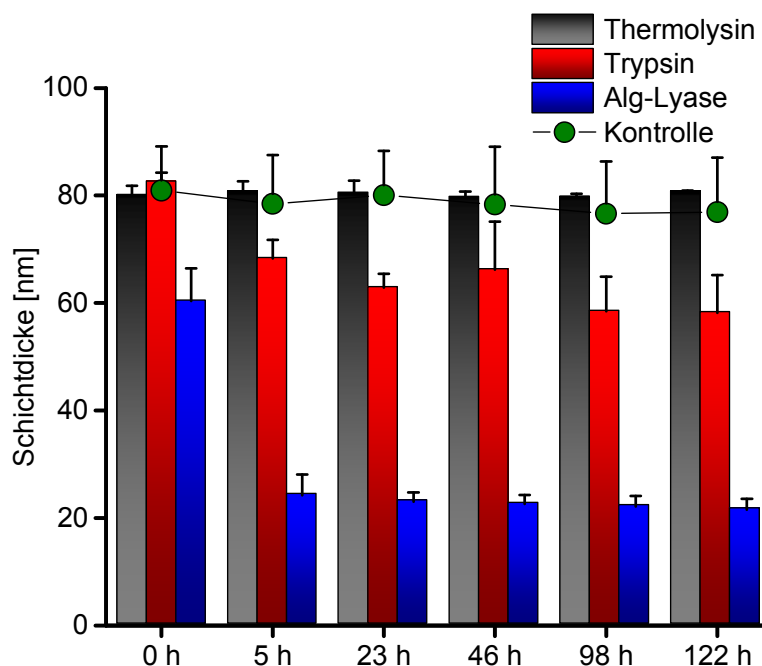


Abbildung 6—62 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenänderung von Alg/αPLL-Beschichtungen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) nach Inkubation in Reinstwasser (Kontrolle), Trypsin-, Thermolysin und Alginat-Lyase-Lösungen (jeweils 2,5 µg/mL in Reinstwasser). TiAl6V4-Substrate wurden mit der PEI-Grundschrift (5 % w/w) in einem einminütigen Tauchprozess beschichtet, bevor eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 µL) mit den Alg/Peptid-Nanopartikeln erfolgte. n = 3.

Die Stabilität der Alg/αPLL-Beschichtungen in Gegenwart von Trypsin wurde zusätzlich durch Messungen mit einer Quarzkristallmikrowaage (QCM) untersucht. Dafür wurde ein mit Titan bedampfter QCM-Kristall gemäß der etablierten Beschichtungsprozedur erst mit einer PEI-Grundschrift versehen, bevor etwa 20 µL der Alg/αPLL-Nanopartikelsuspension durch Sprühbeschichtung aufgebracht wurden. Anschließend wurde das Schwingungsverhalten des beschichteten QCM-Kristalls mithilfe der QCM untersucht (siehe Abbildung 6—63), indem zunächst die Basislinie in Reinstwasser bestimmt wurde. Nach etwa 20 Minuten wurde das Laufmittel auf eine 2,5 µg/mL-konzentrierte Trypsinlösung (in Reinstwasser) gewechselt. Der resultierende Frequenzanstieg könnte mit dem partiellen Abbau der Alg/αPLL-Beschichtung erklärt werden, die vermutlich durch eine enzymbedingte Degradation verursacht wird. Das erneute Wechseln des Eluenten auf Reinstwasser nach 200 min lieferte eine zweite Basislinie bei erhöhter Frequenz. Aus der Frequenzänderung, hervorgerufen durch das Spülen mit der Trypsinlösung, konnte letztlich die Schichtdickenabnahme nach dem in Kapitel 5.5 vorgestellten SAUERBREY-Modell für starre Filme mit $7,3 \pm 0,4$ nm berechnet werden, welche einer Frequenzänderung von 20 – 30 Hz entspricht. Bei der Bestimmung der Schichtdickenabnahme über Ellipsometrie ergab sich für denselben QCM-Kristall ein Wert von 11 ± 3 nm ausgehend von einer initialen Schichtdicke von 42 ± 8 nm. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die QCM-Untersuchungen mit den ellipsometrischen

Messungen in Übereinstimmung gebracht werden können. Ferner konnte die in Abbildung 6—62 gezeigte Trypsin-bedingte Degradation der Alg/ α PLL-Beschichtung bestätigt werden.

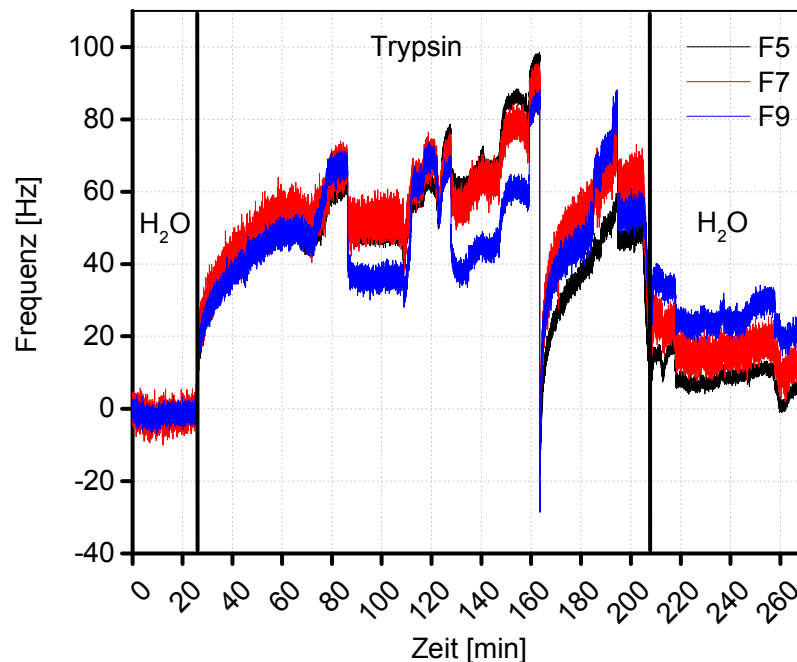


Abbildung 6—63 Frequenzverschiebung von Alg/ α PLL-beschichteten QCM-Sensoren während der Inkubation in Wasser und wässriger Trypsinlösung (2,5 μ g/mL). Dargestellt sind die Frequenzobertöne F5, F7 und F9. Die y-Achse ist von -40 bis 110 Hz skaliert.

Inkubationsversuche wurden auch mit dem Alg/NITEGE-Nanopartikelsystem durchgeführt, indem wiederum jeweils drei Substrate aus Reintitan für drei Minuten (etwa 20 μ L) sprühbeschichtet wurden. Anschließend wurden die beschichteten Plättchen bei 37 °C in Reinstwasser als Kontrolle und in Lösungen von Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Proben entnommen, im Stickstoffstrom getrocknet und am Ellipsometer vermessen. Aus Abbildung 6—64 kann entnommen werden, dass sich die anfänglichen Schichtdicken von ungefähr 50 – 60 nm in allen betrachteten Medien bereits nach vier Stunden verringern. Die Schichtdickenabnahme ist in Reinstwasser mit etwa 10 nm im Vergleich zu den Enzym-Konditionen bedeutend geringer und schreitet während der Inkubationszeit nur langsam voran. Bei den Inkubationen in Gegenwart der Enzym Lösungen kann eine plötzliche Schichtdickenabnahme von etwa 20 – 30 nm im Verlauf von vier Stunden beobachtet werden, die im weiteren Verlauf bis 67 h jedoch weitgehend stagniert. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Alg/NITEGE-Beschichtungen in den getesteten Medien eine eingeschränkte Stabilität aufweisen. Diese Beobachtung wurde für die Kontrolle nicht erwartet, da die Stabilität der Partikel durch entsprechende Dynamische Lichtstreuungsmessungen in Reinstwasser bei 37 °C gemäß Abbildung 6—50 überprüft wurde. Nichtsdestotrotz wäre es möglich, dass die beschichteten Alg/NITEGE-Partikel auf der PEI-

Grundsicht nur unzureichend adhären und daher durch das umgebende Medium fortgewaschen werden können. Für die drei untersuchten Enzymlösungen wurde nach den Ergebnissen in Abbildung 6—50 die Abnahme der Schichtdicken insofern erwartet, als dass die Partikel bereits in Suspension anhand der DLS-Messungen eine Degradation zeigten. Bei den Befunden muss klar herausgestellt werden, dass die Schichtdickenabnahme in Gegenwart von Enzymen, verglichen mit der Reinstwasser-Referenz, deutlich gravierender ist. Hierbei lässt sich die Verringerung der Schichtdicken vermutlich als Kombination von Löslichkeitseffekten und einer Enzym-initiierten Degradation verstehen.

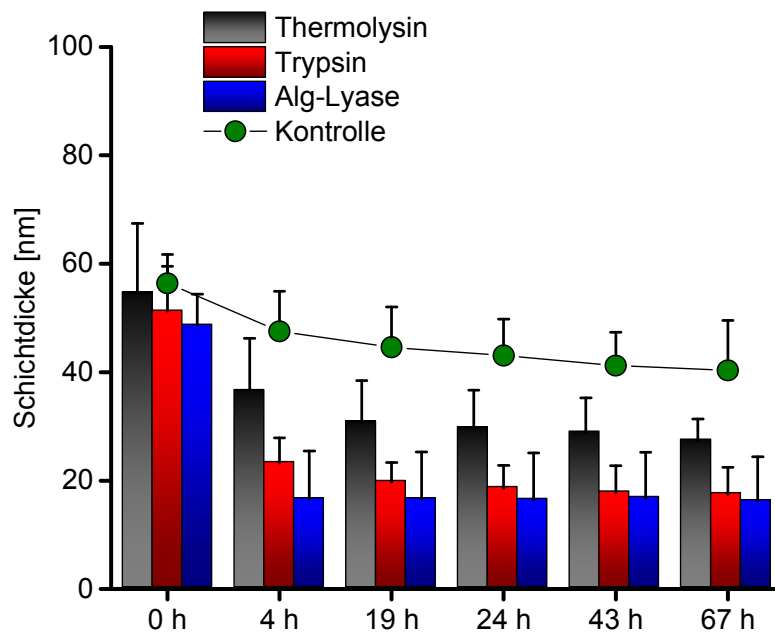


Abbildung 6—64 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenänderung von Alg/NITEGE-Beschichtungen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) nach Inkubation in Reinstwasser (Kontrolle), Trypsin-, Thermolysin und Alginat-Lyase-Lösungen (jeweils 2,5 µg/mL in Reinstwasser). TiAl6V4-Substrate wurden mit der PEI-Grundsicht (5 % w/w) in einem einminütigen Tauchprozess beschichtet, bevor eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 µL) mit den Alg/Peptid-Nanopartikeln erfolgte. n = 3.

6.3.5 Einlagerungsexperimente von IFN β in Alg/NITEGE-Nanopartikel

Die zuvor präsentierten Alg/NITEGE-Nanopartikel wurden analog zum CS/TPP-System als Drug-Delivery-System zur Einkapselung und Freisetzung von Wirkstoffen untersucht. Als Modellwirkstoff wurde zunächst das bereits in Kapitel 4.3 eingeführte Interferon- β (IFN β) verwendet, welches am HZI durch einen Biolumineszenzassay sensitiv nachgewiesen werden kann. Erste Experimente wurden mit *nicht-kommerziellem* IFN β aus dem HZI durchgeführt, indem die Alginatlösung vorgelegt und eine bestimmte Menge des IFN β hinzu pipettiert wurde. Anschließend erfolgte die Partikelbildung durch die Zugabe der Peptidkomponente, bevor die beladenen Partikel durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt wurden. Der Überstand wurde zu einer Mx2Luc2-Zellkultur gegeben. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C

wurde das Medium entfernt und die Zellen lysiert, ehe das Lysat zu Luciferin gegeben und die Lumineszenz gemessen wurde. Das erhaltene Signal wurde mit den Werten einer Verdünnungsreihe verglichen. Durch die Erstellung einer Ausgleichsgeraden mithilfe der Verdünnungsreihe, konnte die Menge an freiem IFN β ermittelt werden. Die Berechnung der jeweiligen Einkapselungseffizienzen erfolgte anschließend nach Gleichung 10.

$$ee [\%] = \frac{\text{gemessene RLU (Partikel + IFN}\beta\text{)}}{\text{gemessene RLU (freies IFN}\beta\text{)}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 11}$$

Mit *nicht-kommerziellem IFN β* konnten lediglich niedrige Einkapselungseffizienzen von $3 \pm 1 \%$ erhalten werden. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass das im HZI synthetisierte IFN β aufgrund der Vielzahl an Proteinverunreinigungen nicht quantitativ in die Alg/NITEGE-Partikel eingelagert werden konnte. Dieser Sachverhalt wurde bereits für die Einkapselung von IFN β in die CS/TPP-Partikel in Kapitel 6.1.3, beginnend auf Seite 71, diskutiert. Sämtliche weiterführenden Untersuchungen wurden daher mit dem *kommerziell erworbenen IFN β* von PBL ASSAY SCIENCE durchgeführt. Dadurch konnten definierte Konzentrationen des Proteins während der Nanopartikelpräparation verwendet werden. Das Screening verschiedener IFN β -Konzentrationen (500, 1.000, 2.500 und 5.000 U/mL) zeigte für 5.000 U/mL eine gute Reproduzierbarkeit der Einkapselungseffizienzen mit $29 \pm 6 \%$. Damit konnte die Inkorporierung des *kommerziellen Proteins* in die Alg/NITEGE-Nanopartikel gegenüber dem *nicht-kommerziellen IFN β* um den Faktor 10 gesteigert werden. Die Einkapselungseffizienz wird vermutlich durch die hohe Hydrophobizität des IFN β limitiert, die in Lösung meistens durch Stabilisatoren wie humanes Serumalbumin oder Mannitol kompensiert wird. Zusätzlich sind, ähnlich wie beim CS/TPP-System, unerwünschte Wechselwirkungen mit Polysacchariden denkbar, welche die Einkapselungseffizienz einschränken. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden für alle weiteren Freisetzungsexperimente IFN β -Konzentrationen von 5.000 U/mL verwendet.

Neben den Einkapselungseffizienzen wurden die Partikelgrößenverteilungen der mit *kommerziellem IFN β* beladenen Alg/NITEGE-Nanopartikel evaluiert. Für das Alg/NITEGE-System mit *kommerziellem IFN β* konnten laut Abbildung 6–65 enge Partikelgrößenverteilungen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $158 \pm 1 \text{ nm}$ und einem niedrigen PDI von $0,18 \pm 0,03$ erhalten werden. Durch die hohe Reinheit des *kommerziellen IFN β* können demnach Kontaminationen weitgehend vermieden werden, welche die Partikelgrößenverteilungen negativ beeinflussen könnten. Bedingt durch die

hohe Aktivität des Proteins genügen ferner kleinste Volumina der IFN β -Stammlösung, um nachweisbare Konzentrationen für die Auswertung mit dem Luciferase-Test zu erhalten.

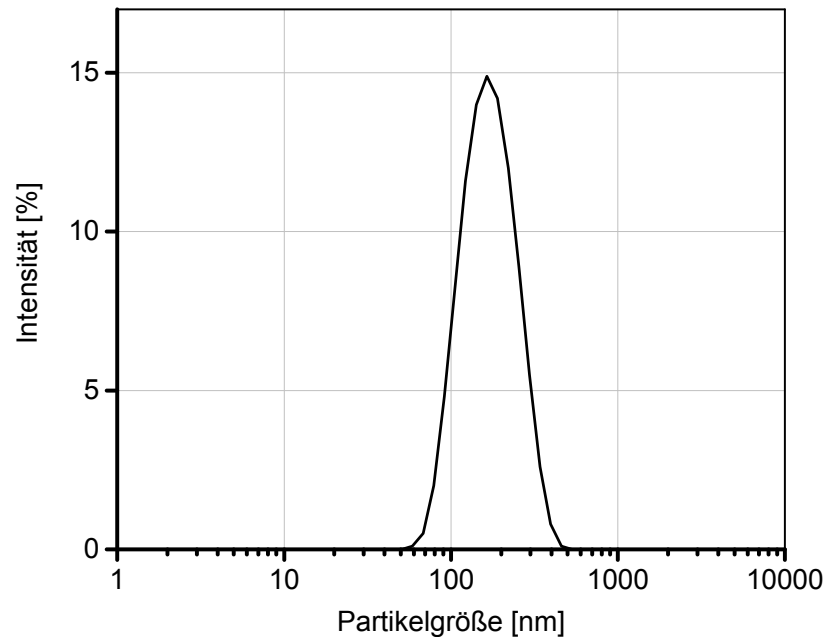


Abbildung 6—65 Intensitätsverteilung von Alginat/NITEGE-Partikeln mit *kommerziellem IFN β* (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1-Verhältnis mit 5.000 U/mL IFN β).

6.3.6 Freisetzungsstudien aus Alg/IFN β /NITEGE-Beschichtungen^{xxxii}

Die Evaluierung der Freisetzungskinetik der Alg/NITEGE-Nanopartikelformulierungen mit dem Modellwirkstoff IFN β erfolgte mit dem zellbasierten Mx2Luc2-Assay analog zu Kapitel 6.1.4, indem zunächst polierte Titansubstrate (Reintitan, medizinische Qualität 4) mit den Suspensionen sprühbeschichtet wurden. Für sämtliche Untersuchungen wurde *kommerzielles IFN β* mit einer Aktivität von 5.000 U/mL verwendet, das Beschichtungsvolumen betrug ungefähr 20 μ L (entspricht etwa 0,02 mg). Anschließend wurden die beschichteten Substrate am HZI bei 37 °C in verschiedenen Medien inkubiert (Standardzellkulturmedium DMEM mit und ohne fötalem Kälberserum sowie PBS). Nach definierten Zeitpunkten wurde ein 0,1 mL Aliquot entnommen und 1:10 mit DMEM verdünnt. 0,5 mL der Lösung wurden für 24 h auf Mx2Luc2-Zellen gegeben und anschließend durch den in auf Seite 192 beschriebenen Luciferase-Test analysiert.

Die in Abbildung 6—66 dargestellten Ergebnisse zeigen den „Fold-Induction-Wert“, d.h. den Quotienten aus gemessener IFN β -Aktivität im Überstand der mit Alg/IFN β /NITEGE beschichteten Plättchen und der Basalwert der Mx2Luc2-Zellen, über die Inkubationsdauer

^{xxxii} Sämtliche IFN β -Freisetzungsexperimente wurden zusammen mit Herrn Jan Riedel (M.Sc.) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

in verschiedenen Medien. Die Inkubationen in DMEM-Konditionen, mit und ohne fötalem Kälberserum (FBS), liefern nach 0,5 h mit einem Wert von 5-6 gegenüber der PBS-Kontrolle mit 1 einen signifikant höheren „Fold-Induction-Wert“. Auch die Untersuchungen zu den Zeitpunkten 2 und 24 h zeigten im Vergleich zu der Inkubation in PBS eine erhöhte IFN β -Freisetzung. Erneut kann eine Abnahme der IFN β -Aktivität über die Zeit beobachtet werden, die bereits in Kapitel 6.1.4 mit der mangelnden Stabilität des Proteins erklärt wurde.

Die Experimente bescheinigen die Stabilität der Alg/IFN β /NITEGE-Nanopartikelbeschichtungen in PBS-Bedingungen, die keine Freisetzung von IFN β zeigen, über den betrachteten Zeitraum von 24 h. Weiterhin ist eine vorzeitige, unerwünschte Freisetzung des IFN β in Gegenwart von DMEM wahrscheinlich. Im Vergleich mit dem CS-58/IFN β /TPP-System wird demnach derselbe Trend beobachtet, wenngleich der „Fold-Induction-Wert“ um den Faktor 5 erniedrigt ist. Diese Differenz könnte damit erklärt werden, dass vermutlich durch den Waschschrift signifikante Mengen an IFN β entfernt werden, die für die Biolumineszenz-Messung nicht mehr zur Verfügung stehen.

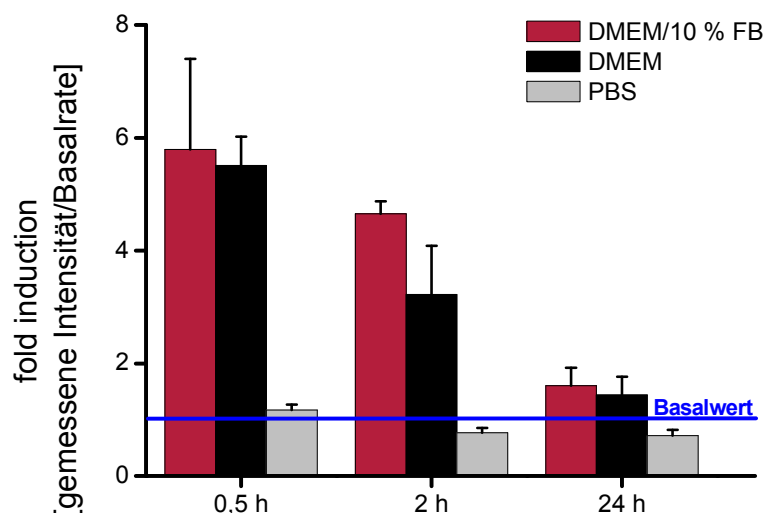
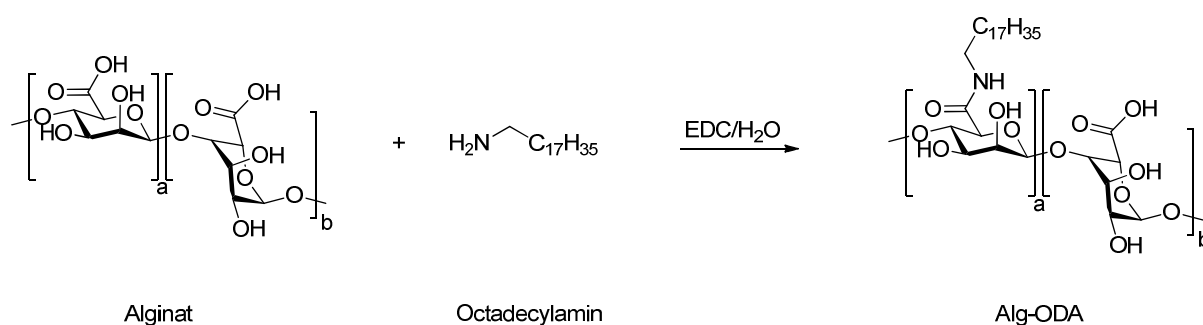


Abbildung 6—66 Fold-Induction-Werte (gemessene Intensität/Basalwert der Mx2Luc2-Zellen) der mit Alg/IFN β /NITEGE-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in DMEM/10 % FBS; DMEM und PBS (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1, 5.000 U/mL IFN β). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 3.

Der vorzeitige Release des IFN β in Gegenwart von Zellkulturlösungen könnte mit der Anwesenheit mehrwertiger, kationischer Fremdionen erklärt werden, welche mit dem Alginat deutlich besser wechselwirken als der NITEGE-Crosslinker. Der damit verbundene Ionenaustausch würde eine Reorganisation der Beschichtung bewirken, die in einer vermehrten Freisetzung von IFN β resultiert. Gemäß Herstellerangaben sind neben multivalenten Erdalkalimetallionen von Calcium und Magnesium, auch Eisen(III)-Ionen und

verschiedene geladene Aminosäuren in der DMEM-Zellkulturlösung präsent, die mit den Beschichtungen interagieren könnten.²⁴⁶ Als weiterer Grund für die unkontrollierte Freisetzung von IFN β könnte die Hydrophobizität des Proteins angeführt werden. Dadurch besteht vermutlich keine ausreichende Wechselwirkung mit den hydrophilen Alginat/NITEGE-Nanopartikeln, sodass eine Freisetzung sehr wahrscheinlich ist. Für die Optimierung des Systems könnte sich demnach ähnlich wie bei den CS/TPP-Formulierungen eine kovalente Vernetzung der Partikel anbieten, um die Stabilitätsproblematik unter Kontrolle zu bringen. Speziell bei den Alginat/NITEGE-Partikeln könnte zusätzlich eine hydrophobe Modifikation des Natriumalginats die Wechselwirkung zwischen Polymer und Wirkstoff verstärken. Ein erster Ansatz wurde bereits getestet, indem beispielsweise die freien Carboxylgruppen des Alginats nach einer abgeänderten Vorschrift von GALANT et al. gemäß Reaktionsschema 6-10 durch eine Amidkupplung mit Octadecylaminresten (ODA) versehen wurden.²⁴⁷ Die Reaktion wurde in Wasser durchgeführt, als Kupplungsreagenz wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) verwendet.



Reaktionsschema 6-10 EDC-initiierte Kupplung von Alginat mit Octadecylamin in Wasser zu Alg-ODA.

Es konnten insgesamt drei Octadecylamin-Alginatderivate (Alg-ODA) synthetisiert werden. Die Ansätze dienten zur Untersuchung des Einflusses von EDC, indem das EDC/Alginat-Verhältnis variiert wurde, während das Octadecylamin/Alginat-Verhältnis konstant gehalten wurde. Die isolierten Polymere wurden durch elementaranalytische Untersuchungen charakterisiert und lieferten Octadecylamin-Substitutionsgrade von 12 %, 9 % und 7 %, die in direkter Korrelation mit dem EDC/Alginat-Verhältnis stehen. Das Alg-ODA mit dem höchsten Substitutionsgrad von 12 % wurde zur Nanopartikelbildung mit der Peptidsequenz NITEGE eingesetzt. Hierfür wurde nach dem Standardprotokoll verfahren, indem 1 mg/mL konzentrierte Alginat-Octadecylamin- und NITEGE-Lösungen in Reinstwasser hergestellt wurden. Für die Partikelpräparation wurde ein 1:1-Verhältnis der Komponenten gewählt, um einen Vergleich gegenüber den herkömmlichen Alg/NITEGE-Partikel anstellen zu können. Die

Dynamischen Lichtstreuexperimente (siehe Anhang 10-9) zeigen eine Partikelgröße von 213 ± 2 nm und einen PDI von $0,17 \pm 0,01$ für die Alg-ODA/NITEGE-Partikel. Damit lassen sich, im Rahmen der Messungenauigkeit, ähnlich enge Partikelgrößenverteilungen wie bei den Alg/NITEGE-Partikeln (PDI von $0,16 \pm 0,02$) erhalten, deren hydrodynamischer Durchmesser mit 143 ± 25 nm jedoch um etwa 70 – 80 nm kleiner ist. Diese Diskrepanz könnte aus der Verringerung der negativen Ladungen infolge der Substitution mit Octadecylamingruppen resultieren, da durch die Amidkupplung der Anteil an dissoziierbaren Carboxylgruppen abnimmt. Dadurch stehen weniger Ladungen für die Partikelbildung mit NITEGE zur Verfügung, woraus ein Anstieg der Partikelgröße vermutet wird. Zetapotentialuntersuchungen lieferten für die Alg-ODA/NITEGE-Partikel mit dem höchsten Substitutionsgrad von 12 % einen Wert von -24 ± 1 mV und verdeutlichen damit die vermutete Verringerung der negativen Ladungen im Vergleich zu Alg/NITEGE mit -39 ± 1 mV (Anhang 10-10). Die Partikel wurden für die Einkapselung von IFN β nicht weiter in Betracht gezogen, da sich bei Stabilitätsuntersuchungen eine spontane Partikelgrößenzunahme herausstellte. Die unzureichende Stabilität der Nanopartikel lässt sich somit gemäß PUJALA et al. mit dem gemessenen Zetapotential in Einklang bringen.²³⁹

6.3.7 Einlagerungs- und Freisetzungsstudien mit eGFP

Zusätzlich zur Inkorporation von IFN β wurden die Alginat/Peptid-Partikel als Freisetzungssystem für das fluoreszierende Protein eGFP (enhanced green fluorescent protein) untersucht. Es wurde ein entsprechendes Volumen eGFP zum Natriumalginat gegeben und homogenisiert. Daraufhin wurde der jeweilige Crosslinker α PLL, NITEGE oder NVTEGE hinzupipettiert. Die Konzentration von eGFP entsprach, analog zu den CS/eGFP/TPP-Experimenten, $1,47 \times 10^{-3}$ μ mol/mL (siehe Kapitel 6.1.5 auf Seite 79). Anschließend wurde ein optionaler 15-minütiger Zentrifugationsschritt (16.800 Umdrehungen pro Minute) eingeführt, um die Partikel zu sedimentieren und über die Restfluoreszenz im Überstand die Einkapselungseffizienz zu ermitteln. Als Kontrollen wurden sowohl Alg/Peptid-Partikel ohne eGFP, die als Basalwert ein Fluoreszenzsignal von ungefähr 3.000 Counts lieferten, als auch eine gleichkonzentrierte eGFP-Lösung in Reinstwasser verwendet. Die Proben wurden in Triplikaten in eine 24-Well-Plate pipettiert und 1:4 mit Reinstwasser verdünnt, bevor eine fluorometrische Messung bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge bei 535 nm erfolgte. Die in Abbildung 6—67 dargestellten Ergebnisse zeigen, analog zu den CS/eGFP/TPP-Proben auf Seite 81, bei sämtlichen nichtzentrifugierten

Proben ähnlich hohe Fluoreszenzsignale von etwa 2.000.000 Counts wie beim freien eGFP. Dieser Befund weist auf eine intakte Proteinstruktur hin, da die Aktivität des inkorporierten Proteins weitgehend erhalten bleibt.²⁰⁷ Weiterhin konnte eine geringe Abnahme des Fluoreszenzsignals bei allen zentrifugierten Alg/eGFP/Peptid-Nanopartikelformulierungen beobachtet werden. Im Vergleich zu den nichtzentrifugierten Proben und der eGFP-Kontrolle konnte eine Fluoreszenzverringering von 5-10 % festgestellt werden, die auf eine partielle Einlagerung des eGFPs schließen lässt. Bereits in Voruntersuchungen wurde die unvollständige Sedimentation der Alg/Peptid-Nanopartikel beobachtet, sodass über die Abnahme der Fluoreszenz im Überstand vermutlich nur ein Teil des eingekapselten eGFPs nachgewiesen wurde. Zudem sollte die Belastbarkeit der Ergebnisse angesichts der statistischen Abweichungen der Messwerte mit Vorsicht betrachtet werden.

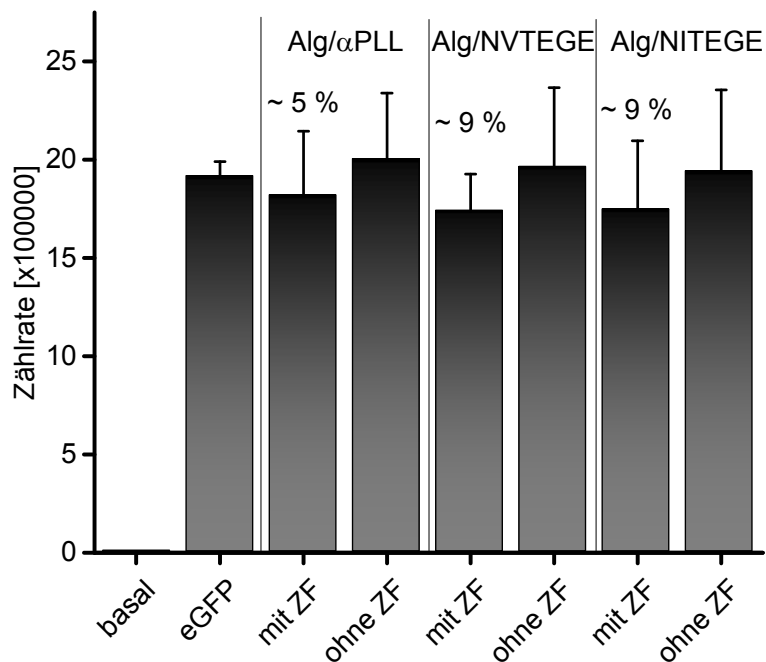


Abbildung 6—67 Fluoreszenzsignale der Alg/eGFP/Peptid-Formulierungen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnisse 4:1 für Alg/αPLL und 1:1 für Alg/NI(V)TEGE, $1,47 \times 10^{-3}$ μmol/mL eGFP) mit und ohne Zentrifugationsschritt (ZF, 15 min, 16.800 Umdrehungen pro Minute). Die eigentliche Fluoreszenzmessung erfolgte im Überstand der Proben. Als Kontrollen wurden Alg/Peptid-Suspensionen und $1,47 \times 10^{-3}$ μmol/mL freies eGFP in Reinstwasser verwendet. n = 3.

Um die statistisch nicht signifikante Abnahme des Fluoreszenzsignals weitergehend zu untersuchen, wurden ähnlich wie bei den CS/eGFP/TPP-Formulierungen die Sedimente resuspendiert, indem die erhaltenen Rückstände zunächst zweimal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend in Reinstwasser redispergiert wurden. Nach der fluorometrischen Messung konnte für die Alg/eGFP/Peptid-Formulierungen allerdings kein Fluoreszenzsignal erhalten werden, welches sich von dem Basalwert deutlich unterschied. Infolge der Waschschrte verarmen die sedimentierten Alg/eGFP/Peptid-Partikel

wahrscheinlich derart an eGFP, dass die Konzentration des Proteins bei der Redispergierung unter der Nachweisgrenze des verwendeten Fluorometers liegt. Es wurden die Alg/eGFP/Peptid-Suspensionen auf Titansubstrate (medizinische Qualität 4) aufgebracht und bei 37 °C in Reinstwasser inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden 100 µL des Überstandes entnommen und fluorometrisch vermessen (siehe Abbildung 6—68b). Zeitgleich wurde eine eGFP-Konzentrationsreihe unter den gleichen Bedingungen inkubiert und zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht (siehe Abbildung 6—68a). Analog zu den Experimenten mit den CS/eGFP/TPP-Systemen wurden pro Titanplättchen aufgrund des Beschichtungsvolumens von ungefähr 20 µL etwa $2,94 \times 10^{-5}$ µmol eGFP aufgebracht. Die Konzentrationsreihe wurde in dem Bereich von $0,092 \times 10^{-5}$ bis $2,94 \times 10^{-5}$ µmol/mL gewählt. Bei den Konzentrationsreihen wurde erneut eine signifikante Abnahme der Intensität des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Inkubationszeit festgestellt. Dieses Verhalten wurde bereits bei der Einlagerung und Freisetzung von eGFP aus den CS/TPP-Nanopartikelbeschichtungen auf Seite 79 beobachtet. Aufgrund der thermischen Labilität des Proteins konnten lediglich die nach 0,5 und 2 h erhaltenen Fluoreszenzsignale zur Auswertung herangezogen werden. Dieser Aktivitätsverlust sollte auch bei den Freisetzungsexperimenten von eGFP aus den Alginat/Peptid-Beschichtungen bedacht werden. Eindeutige Aussagen lassen sich nur für die niedrigste Inkubationszeit treffen. Aus Abbildung 6—68b kann entnommen werden, dass zumindest für die beschichteten Alg/eGFP/Ni(V)TEGE-Formulierungen gegenüber dem Basalwert (bei 2.800 ± 235 Counts) ein leicht erhöhtes Fluoreszenzsignal (bei 4.900 ± 342 Counts) nach 0,5 h Inkubationszeit beobachtet werden konnte. Für das Alg/eGFP/αPLL-System konnte ähnlich wie bei der zuvor vorgestellten CS-83/eGFP/TPP-Formulierung kein eindeutiger Unterschied zwischen dem Basalwert beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen wiederum dafür, dass die Alg/αPLL-Beschichtungen eine ausreichende Stabilität besitzen, die eine eGFP-Freisetzung weitestgehend verhindern. Demgegenüber bestätigt sich die bereits vermutete, geringere Stabilität der Alginat/Ni(V)TEGE-Beschichtungen in wässrigen Medien. Dadurch gilt ein Abbau bzw. eine Ablösung der Beschichtung als sehr wahrscheinlich, die zu einer Freisetzung des eGFPs in den Überstand führen würde und in einem erhöhten Fluoreszenzsignal resultiert.

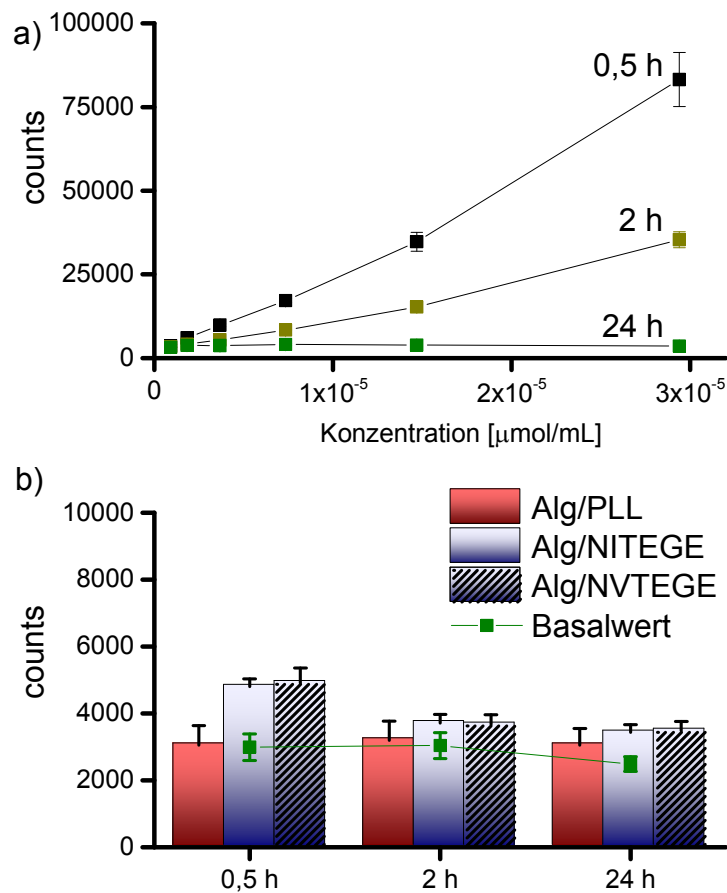


Abbildung 6—68 a) Konzentrationsreihe von eGFP bei verschiedenen Zeitpunkten. b) Fluoreszenzsignale der mit Alg/eGFP/Peptid-beschichteten Titansubstrate (medizinische Qualität 4) in Reinstwasser bei 37 °C (Volumenverhältnisse 4:1 für Alg/αPLL und 1:1 für Alg/Ni(V)TEGE, 2,94x10⁻⁵ μmol eGFP pro Plättchen). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Überstand der inkubierten Substrate. Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μL. n = 3.

Die erhaltenen Fluoreszenzsignale der Alginat/eGFP/Ni(V)TEGE-Beschichtungen nach 0,5 h konnten mithilfe der zuvor aufgenommenen Konzentrationsreihe entsprechend umgerechnet werden. Dabei wurden für Alginat/eGFP/NITEGE $2,1 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}$ μmol/mL und für Alginat/eGFP/NVTEGE $2,1 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-7}$ μmol/mL eGFP berechnet. Im Vergleich mit der beschichteten Menge an eGFP resultieren daher für Alginat/eGFP/NITEGE 7 ± 1 % und für Alginat/eGFP/NVTEGE 7 ± 2 %. Diese Werte stimmen sehr gut mit der in Abbildung 6—67 gezeigten prozentualen Abnahme des Fluoreszenzsignals um etwa 9 % durch die Einführung eines Zentrifugationsschrittes überein. Durch die Immobilisierung der Alginat/eGFP/Ni(V)TEGE-Partikel und der Inkubation in Reinstwasser-Konditionen konnte somit eine Freisetzung des eGFPs beobachtet werden. Die bereits vorher gezeigte unspezifische Freisetzung des IFNβ konnte abschließend mit dem fluoreszierenden Protein eGFP bestätigt werden. Vermutlich spielt ähnlich wie bei dem CS-58/eGFP/TPP-System die gute Löslichkeit der einzelnen Komponenten in wässrigen Medien eine entscheidende Rolle. Infolge der Inkubation in Reinstwasser kommt es zu einem Abbau bzw. einer Auflösung der

Beschichtungen, der eine eGFP-Freisetzung nach sich zieht. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurden die beschichteten Substrate am Ellipsometer vermessen, um ähnlich wie in Kapitel 6.3.4, die Freisetzung von eGFP mit den Schichtdickenveränderungen korrelieren zu können. Die zuvor beobachteten gravierenden Schichtdickenabnahmen der Alginat/NI(V)TEGE-Beschichtungen in Reinstwasser bei 37 °C konnten bestätigt werden und führen zu der Schlussfolgerung, dass diese Partikel als Beschichtung eine unzureichende Stabilität aufweisen (Anhang 10-11). Damit gilt eine unspezifische Freisetzung des inkorporierten Proteins als sehr wahrscheinlich. Demgegenüber lassen sich die Alginat/ α PLL-Nanopartikelbeschichtungen zumindest bei den gewählten Inkubationsbedingungen (37 °C in Reinstwasser) nicht degradieren. Da sich die Alginat/ α PLL-Partikel aufgrund ihrer fehlenden spezifischen Spaltsequenz nicht für eine gezielte Wirkstofffreisetzung eignen, müssten die Aggrecanase-labilen Alginat/NI(V)TEGE-Formulierungen in ihrer Stabilität optimiert werden. Die auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierenden Partikel könnten durch die Einführung von chemischen Funktionalitäten kovalent stabilisiert werden. Dabei sollte sorgfältig drauf geachtet werden, dass die Vernetzung nicht mit dem eingelagerten Wirkstoff interagiert. Des Weiteren wäre ein schichtweiser Aufbau der Beschichtungen im Sinne eines Layer-by-Layer-Prozesses denkbar. Durch die gezielte Einführung von stabilisierenden Schichten könnte die Labilität der Beschichtung verringert werden und die Wirkstofffreisetzung verlangsamt werden.

6.3.8 Zelltests

Die Biokompatibilität bzw. die Zellverträglichkeit der Alginat/Peptid-Nanopartikelbeschichtungen wurde mit denen im Kapitel 6.1.6 auf Seite 85 vorgestellten Zelltests untersucht.

CellTiterBlue-Assay für die Nanopartikel

Zunächst wurde ein CellTiterBlue-Assay durchgeführt, indem eine bestimmte Anzahl an Gingivafibroblasten kultiviert wurde, bevor die Alginat/Peptid-Suspensionen hinzugegeben wurden. Durch eine anschließende Quantifizierung lebender Zellen (Abbildung 6—69) konnte die Biokompatibilität der Nanopartikel in Lösung beurteilt werden. Die untersuchten Alginat/Peptid-Suspensionen zeigten, analog zur DMEM-Kontrolle, unabhängig von dem betrachteten Konzentrationsbereich eine hohe Zellviabilität von über 100 %. Lediglich für das Alginat/NITEGE-System konnte bei der niedrigsten Konzentration (12,5 µg/mL) eine um

etwa 25 % schlechtere Zellviabilität im Vergleich zur DMEM-Kontrolle festgestellt werden, die bei höheren Konzentrationen jedoch nicht mehr präsent ist. Die Ergebnisse des CellTiterBlue-Assays bescheinigen damit im betrachteten Konzentrationsbereich die gute Biokompatibilität der untersuchten Nanomaterialien. Offensichtlich wird durch die Zugabe der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen die metabolische Aktivität der Gingivafibroblasten nicht negativ beeinflusst.

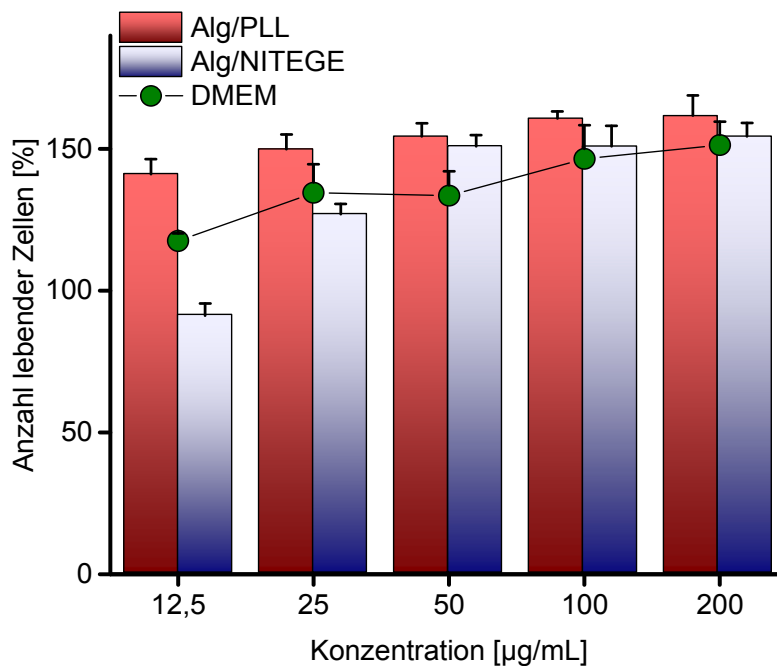


Abbildung 6—69 CellTiter-Blue-Assay der Alginat/αPLL- (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) und Alginat/NITEGE-Nanopartikel-Suspensionen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1).

Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) der Nanopartikel

Der in Kapitel 6.1.6 vorgestellte Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) wurde für die Evaluierung der Membranintegrität verwendet. Hierbei wurde von beiden Alginat/Peptid-Suspensionen eine Verdünnungsreihe erstellt und zu einer Zellkultur von humanen Gingivafibroblasten gegeben. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit wurde im Überstand die Menge an LDH gemessen und auf die Anzahl geschädigter Zellen zurückgerechnet. Aus den in Abbildung 6—70 gezeigten Resultaten können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nanopartikelsuspensionen und der DMEM-Kontrolle beobachtet werden. Die Zahl der geschädigten Zellen ist für alle betrachteten Formulierungen unabhängig von der jeweiligen Konzentration sehr gering, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Nanomaterialien in Suspension keinen nachteiligen Effekt auf humane Gingivafibroblasten besitzen. Dieser Befund steht in Einklang mit dem CellTiterBlue-Assay, der bei beiden Alginat/Peptid-Systemen ebenfalls eine gute Zellkompatibilität suggerierte. Diese

Beobachtungen stehen im Einklang mit Arbeiten von RAFIEE et al., in der Calcium-Alginat-Nanopartikel durch einen Thymidin-Aufnahme-Test^{xxxiii} auf ihre Zytotoxizität untersucht wurden. Gegenüber menschlichen embryonalen Nierenzellen konnte keine Beeinträchtigung der Zellviabilität über einen Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden.²⁴⁹

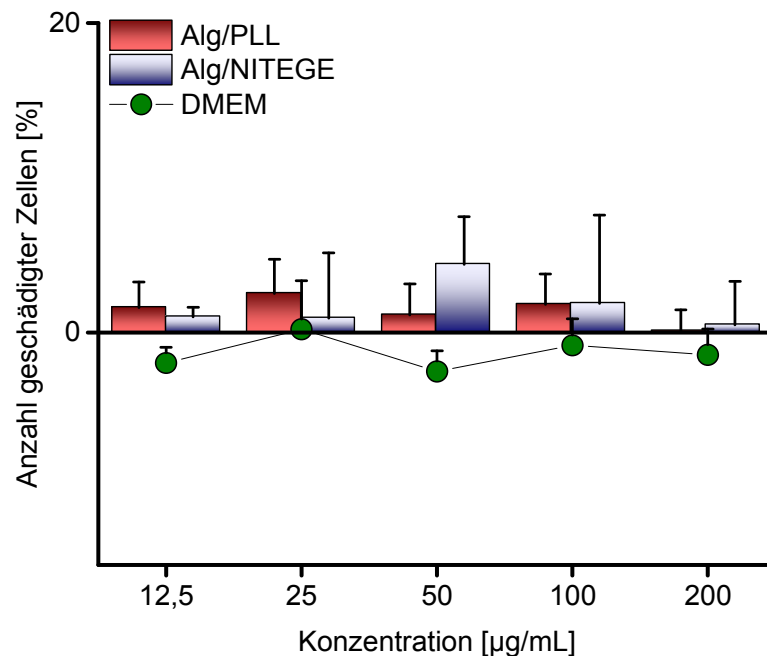


Abbildung 6—70 LDH-Test der Alginat/αPLL- (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) und Alginat/NITEGE-Nanopartikel-Suspensionen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1).

Lactatdehydrogenase-Test (LDH-Test) für die Nanopartikelbeschichtungen

Die Untersuchung der Zelladhäsion zur Bestimmung der Zelladhäsion auf TiAl6V4 (medizinische Qualität 5) erfolgte mithilfe des vorgestellten, modifizierten LDH-Tests (siehe Seite 89). Humane Gingivafibroblasten wurden dazu auf den beschichteten Substraten kultiviert. Infolge einer gezielten Lysierung der Zellen nach 24 respektive 72 h wurde die LDH in das umgebende Medium freigesetzt und quantifiziert. Zusätzlich zu den Nanopartikelbeschichtungen wurde in dem Experiment die Polyethylenimin-Grundsicht auf ihre Zelladhäsion getestet.

In mehreren Veröffentlichungen wird von einer Zytotoxizität von PEI berichtet, die beispielsweise durch die Störung der metabolischen Aktivität der Zellen durch einen MTT-Test nachgewiesen wurde.²⁵⁰ Bislang konnten die zugrunde liegenden Mechanismen nicht eindeutig geklärt werden, eine Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Topologie des PEIs ist jedoch wahrscheinlich.²⁵¹ Prinzipiell sollte die PEI-Grundsicht keinen Einfluss auf die

^{xxxiii} Hierbei wird das radioaktive Nucleosid ³H-Thymidin während der mitotischen Zellteilung in Stränge der chromosomalen DNA eingebaut. Die Messung der Radioaktivität wird durch einen Szintillationsdetektor durchgeführt, um das Ausmaß der Zellteilung gegenüber einer Kontrollprobe zu bestimmen.²⁴⁸

Zelladhäsion und -kompatibilität der Alginat/Peptid-Beschichtungen besitzen, da davon ausgegangen wird, dass die Oberfläche vollständig mit den Nanopartikelsuspensionen bedeckt ist. In der Abbildung 6—71 sind die Ergebnisse des LDH-Tests der Beschichtungen zusammengefasst. Der Zellbewuchs auf der TiAl6V4-Kontrolle wurde auf 100 % normiert und alle anderen Ergebnisse dementsprechend angepasst. Bei den PEI- und der Alginat/ α PLL-Beschichtungen kann bereits nach 24 h eine deutliche Abnahme der Zellzahlen um etwa 50 % gegenüber der TiAl6V4-Kontrolle beobachtet werden, während dieser Unterschied für das Alginat/NITEGE-System mit etwa 25 % weniger stark ausgeprägt ist. Nach 72 h Inkubationszeit, einem Maß für die Proliferation der Zellen auf der Oberfläche, kann jedoch für alle drei Beschichtungen ein im Vergleich zur Titanlegierung deutlich geringerer Zellbewuchs festgestellt werden. Die Ergebnisse des LDH-Tests lassen vermuten, dass die Nanopartikelbeschichtungen die Adhäsion und die Proliferation von Gingivafibroblasten nicht unterstützen. Dieser Befund könnte mit den Benetzungseigenschaften der Oberfläche erklärt werden, welche infolge der Beschichtung mit extrem hydrophilen Alginatketten signifikant verändert wurde.

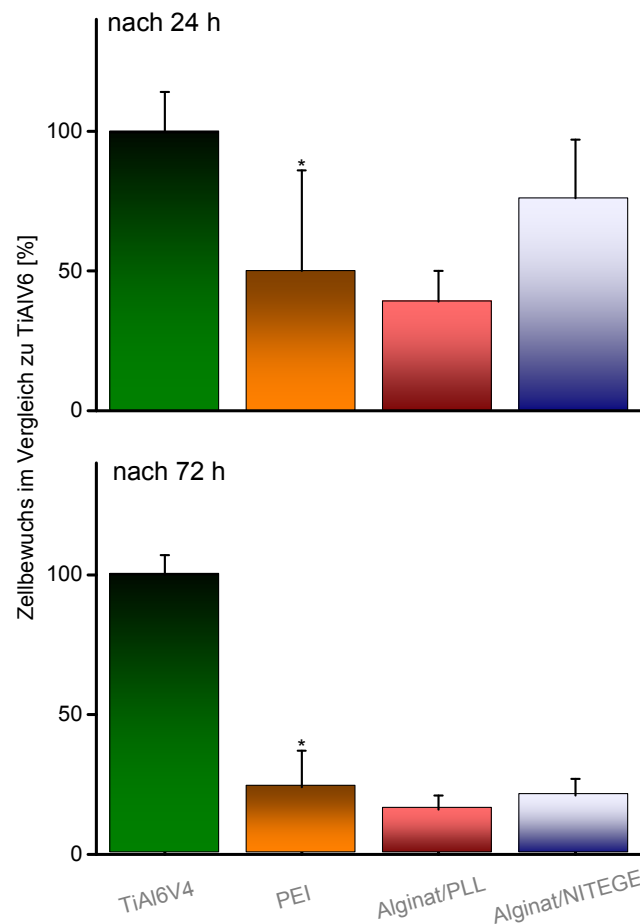


Abbildung 6—71 Ergebnisse des LDH-Tests von humanen Gingivafibroblasten nach 24 und 72 h Inkubationszeit auf PEI-, Alg/ α PLL- und Alg/NITEGE-Beschichtungen mit unbeschichtetem TiAl6V4-Substrat (medizinische Qualität 5) als Kontrolle (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnisse 4:1 bei Alg/ α PLL und 1:1 bei Alg/NITEGE). Die Beschichtungen wurden auf TiAl6V4-Legierung durchgeführt (1 min Tauchbeschichtung von PEI-Lösung und 3 min Spray-Coating der Alginate/Peptid-Suspensionen). Die ermittelten Werte wurden in Relation zur TiAl6V4-Kontrolle gesetzt, die auf 100 % normiert wurde. n = 3. * Die PEI-Beschichtung wurde auf Reintitan der medizinischen Qualität 4 durchgeführt.

Von den inkubierten Substraten wurden nach 24 und 72 h rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) gemacht, um Aussagen über die Zellmorphologie treffen zu können. In Abbildung 6—72 sind lediglich die nach 24 h erhaltenen REM-Bilder dargestellt. Die sehr gute Zellkompatibilität der unbeschichteten Titanlegierung wird deutlich. Die Aufnahmen zeigen einen konfluenten Film aus langgestreckten, ausgebreiteten Zellen, die auf eine gute Adhäsion hinweisen. Bei der Untersuchung der drei Beschichtungen können jedoch runde Zellmorphologien auf der PEI- und auf der Alg/NITEGE-Oberfläche beobachtet werden, während auf der Alg/ α PLL nahezu keine Zellen mehr präsent sind. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse des LDH-Tests (Abbildung 6—71), die einen deutlich schlechteren Zellbewuchs im Vergleich zur Titanlegierung vermuten ließen. Letztlich kann geschlussfolgert werden, dass die verwendete Fibroblastenzelllinie auf den Alg/Peptid-Beschichtungen, vermutlich aufgrund der Hydrophilie des Alginats, nicht ausreichend adhärieren können.²¹²

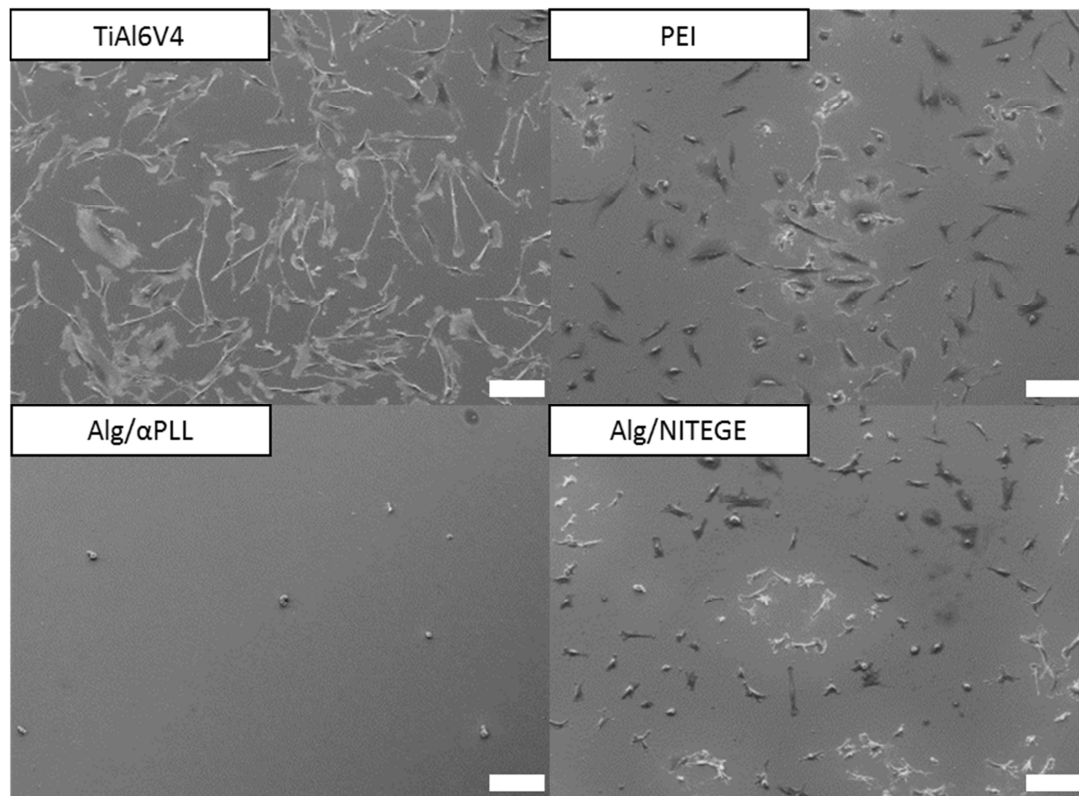


Abbildung 6—72 REM-Aufnahmen der humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem TiAl6V4 (medizinische Qualität 5) und auf PEI-, Alginat/αPLL- und Alginat/NITEGE-Beschichtungen des TiAl6V4 nach 24 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 μm.

Aus den Zelltests konnte einerseits mit dem CellTiterBlue- und dem LDH-Test die geringe Zelltoxizität der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen nachgewiesen werden. Andererseits konnte eine Beeinträchtigung der Adhäsion und der Proliferation der getesteten Gingivafibroblasten auf den beschichteten Substraten beobachtet werden, die vermutlich auf eine zu hohe Hydrophilie der untersuchten Oberflächen zurückzuführen ist. Um die Adhäsion der Zellen zu verbessern, könnten die hydrophilen funktionellen COOH- und OH-Gruppen des Alginatrückgrats entsprechend modifiziert werden.²¹² Hierfür würde sich beispielsweise die Einführung von RGD-haltigen Peptiden eignen, die durch eine Amidkupplung an die freien Carboxylgruppen durchgeführt werden könnte.¹⁴⁶

6.3.9 RGD-Alginat

Im Allgemeinen wird die Wechselwirkung von Zellen mit Biomaterialien durch transmembrane Rezeptoren in der extrazellulären Matrix gesteuert, welche adhäsionsspezifische Moleküle an der Materialoberfläche erkennen.⁹⁶ Als Erkennungsmerkmal gilt die aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure aufgebaute RGD-Sequenz, die ein ubiquitäres Motiv in körpereigenen Proteinen wie Fibronectin, Thrombospondin, Osteopontin, Typ I Kollagen oder Osteonectin darstellt^{96,97}

Frühere Studien, in denen beispielsweise durch die Einführung von entsprechenden RGD-Motiven die Adhäsion von Zellen auf Hydrogelen oder auf Implantatoberflächen verbessert wurde, verdeutlichen das Potential dieser Bindungsdomäne.^{146,252} Auf Grundlage der erfolgreichen Arbeiten von ROWLEY et al. zu Alginathydrogelen als synthetische extrazelluläre Matrixmaterialien sollte im Rahmen dieser Arbeit die Zelladhäsion der betrachteten Materialien nach Einführung von RGD-haltigen Peptiden untersucht werden.¹⁴⁶

Für die Experimente wurde das kommerziell erhältliche cRGD-Alginatderivat (cRGD – commercial RGD) und drei selbst synthetisierte sRGD-Alginatverbindungen (sRGD – synthesized RGD) verglichen. Die sRGD-Derivate wurden nach einer Vorschrift von ROWLEY et al. durch eine Amidkupplung der Peptidsequenz GRGDS an das herkömmliche Natriumalginat mithilfe der Kupplungsreagenzien *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) hergestellt. Insgesamt wurden mit dieser Methode drei verschiedene Produkte mit unterschiedlichen Substitutionsgraden (DS) synthetisiert und als sRGD-100 (DS = 0,26 %), sRGD-250 (DS = 0,73 %) und sRGD-500 (DS = 0,91 %) bezeichnet. Das cRGD-Alginatderivat wurde zusätzlich durch GPC- und elementaranalytische Messungen charakterisiert und die Ergebnisse mit den Herstellerangaben verglichen. Hierbei konnten die Herstellerangaben gemäß Tabelle 6-8 mit einem Molekulargewicht von 75–200 kDa und einem Substitutionsgrad von 0,4 % nicht vollständig bestätigt werden. Zudem wurde dieses Alginat mit der etwas veränderten Peptidsequenz GRGDSP funktionalisiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die untersuchten RGD-Alginatderivate somit grundlegend unterscheiden. Übersichtshalber sind die Eigenschaften der verwendeten cRGD- und sRGD-Derivate nochmals in Tabelle 6-8 zusammengefasst.

Tabelle 6-8 Eigenschaften des kommerziellen RGD-Alginats (cRGD) und der drei synthetisierten RGD-Alginat (sRGD). Das Mannuronsäure zu Guronsäureverhältnis wird als G/M-Verhältnis bezeichnet.

Bezeichnung	cRGD	sRGD
Molekulargewicht	75 – 200 kDa* ~ 196 kDa'	~ 60 kDa'
M/G-Verhältnis	gering	mittel
Peptidsequenz	-GRGDSP	-GRGDS
Substitutionsgrad	0,4 % * 1 % #	0,26; 0,73; 0,91 % #
Partikelbildung	Modifizierung	Standard

* Herstellerangaben; ' durch GPC bestimmt, # durch Elementaranalyse bestimmt

Von den RGD-Derivaten wurden 1 mg/mL konzentrierte Lösungen in Reinstwasser hergestellt und die Nanopartikelbildung mit der Peptidsequenz α PLL getestet. Die Untersuchungen mit dem cRGD-Alginat zeigten gegenüber dem herkömmlichen Alginat/Peptid-System ein komplett unterschiedliches Verhalten bei der Partikelpräparation. Es traten bei den Standardbedingungen vermehrt Aggregationen und Sedimentationen der Partikel auf, sodass der Herstellungsprozess angepasst werden musste. Das während der Arbeit verwendete 4:1-Verhältnis von Natriumalginat zu α PLL musste in 1:4 (cRGD-Alginat: α PLL) geändert werden, um die Abbildung 6—73 gezeigten Partikelgrößenverteilungen mit einem Durchmesser von 200 ± 10 nm und einem moderaten Polydispersitätsindex von 0,4 zu erhalten. Die Ergebnisse der cRGD-Alginat/ α PLL-Partikel weichen von den zuvor vorgestellten Resultaten der Alginat/ α PLL-Partikel mit Partikelgrößen von 330 ± 35 nm signifikant ab. Als Grund könnte die veränderte Präparation angeführt werden. Die Anpassung der Partikelpräparation lässt sich vermutlich aus den strukturellen Unterschieden des herkömmlichen Alginats und des cRGD-Alginats herleiten, die in Tabelle 6-8 zusammengefasst wurden. Schwerwiegender ist dabei wahrscheinlich nicht der Einfluss des, bereits in Abbildung 6—39 auf Seite 122 erläuterten, Mannuronsäure/Guronsäure-Verhältnisses (M/G-Verhältnis) sondern vielmehr das unterschiedliche Molekulargewicht der Polymere. Das M/G-Verhältnis bestimmt gemäß TØNNESEN et al. die Gelationseigenschaften des Alginats und ist daher maßgeblich für die Stärke der Wechselwirkung mit Gegenionen

verantwortlich.¹³⁸ Solche Betrachtungen wurden bereits von SÆTHER et al. am Beispiel der Komplexierung von Alginat mit Chitosan durchgeführt. Dabei resultierte eine Variation des Molekulargewichts von Chitosan zu einer gravierenden Änderung der Partikelgröße. Entgegen früheren Veröffentlichungen konnte von SÆTHER et al. hingegen keine signifikante Abhängigkeit der Partikeleigenschaften vom M/G-Verhältnis des Alginats beobachtet werden.²⁵³ Die Vermutung, dass der Guluronsäuregehalt einen Einfluss auf die Flexibilität der Alginatketten und indirekt damit auf die Partikelpräparation besitzt, konnte von VOLD et al. widerlegt werden.²⁵⁴

Zusätzlich zu dem abweichenden M/G-Verhältnis könnte auch die Amidierung einzelner Carboxylgruppen durch die RGD-Sequenz die Partikelbildung beeinflussen. Da die Substitutionsgrade und die Länge des jeweiligen RGD-Motivs jedoch vergleichbar sind, wird dieser Effekt nur untergeordnet bewertet.

Zusätzlich wurden die selbst synthetisierten sRGD-Alginatderivate untersucht, die bei der Partikelherstellung im herkömmlichen 4:1-Verhältnis eingesetzt werden konnten. Dabei konnten durch Dynamische Lichtstreuungsmessungen unabhängig vom Substitutionsgrad des sRGD-Alginats Partikeldurchmesser von etwa $330 - 370 \pm 20$ nm ermittelt werden. Damit weisen die hergestellten Nanopartikel im Vergleich zum herkömmlichen Alginat/ α PLL-System vergleichbare Partikelgrößen auf. Ferner kann in Anbetracht der geringen Polydispersitäten von 0,18 – 0,27 davon ausgegangen werden, dass die Präparation erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zudem kann das Zetapotential der cRGD-100/ α PLL-Formulierung (-56 ± 2 mV) im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Wert der Alginat/ α PLL-Nanopartikel (-48 ± 1 mV) korreliert werden. Abschließend kann festgestellt werden, dass sich die selbst synthetisierten sRGD-Alginatderivate von dem herkömmlichen Natriumalginat nur geringfügig unterscheiden. Durch die Amidierung einzelner, weniger Carboxylgruppen wurde das Molekulargewicht und die Uronsäurezusammensetzung anscheinend nur unwesentlich beeinflusst. Im Gegensatz zu dem kommerziellen cRGD-Alginat konnten auf diese Weise Derivate synthetisiert werden, die sich deutlich einfacher mit dem herkömmlichen Alginat/ α PLL-System vergleichen lassen.

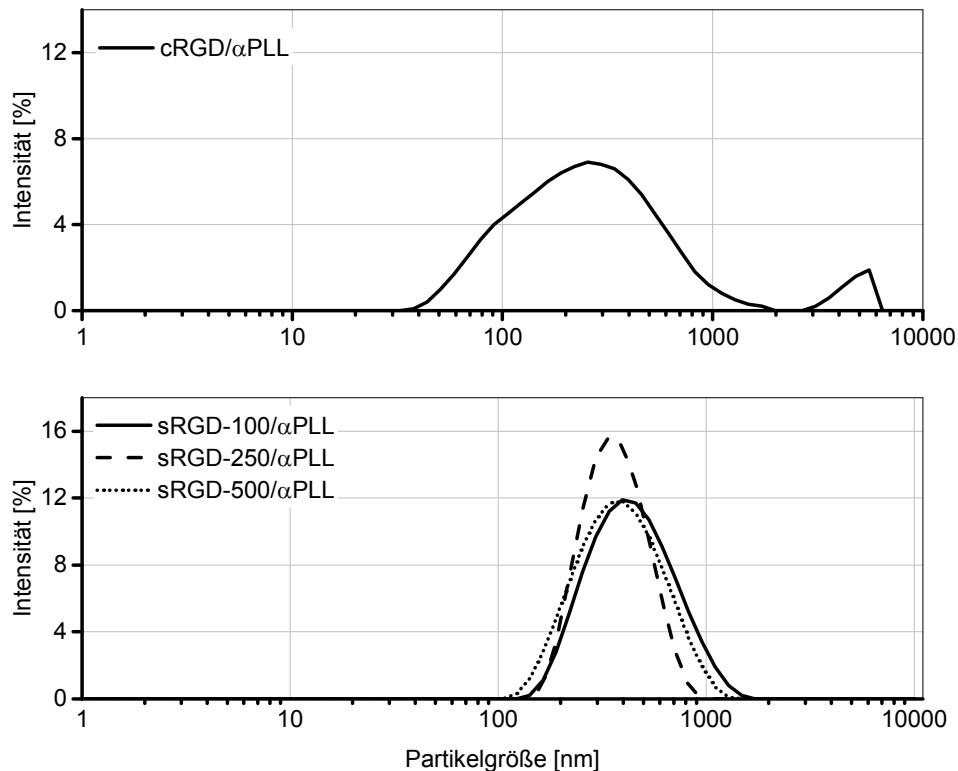


Abbildung 6—73 Partikelgrößenmessung der cRGD-Alginat/αPLL-Formulierung (je 1 mg/mL, Verhältnis 1:4 in Reinstwasser) und der sRGD-Alginat/αPLL-Formulierungen (je 1 mg/mL, Verhältnis 4:1 in Reinstwasser).

Nach der Präparation und Charakterisierung der RGD-Alginat/αPLL-Nanopartikel wurde die Zelladhäsion auf den Materialien als Beschichtung auf Reintitan (medizinische Qualität 4) evaluiert. Dafür wurden Titansubstrate zunächst mit einer PEI-Grundsicht versehen, bevor die Nanopartikelsuspensionen, wie auf Seite 140 beschrieben, mithilfe eines Sprühprozesses aufgebracht wurden. Die Reproduzierbarkeit der Beschichtungen für die sRGD-Alginat/αPLL-Beschichtungen wurde wiederum durch ellipsometrische Messungen überprüft (siehe Anhang 10-12). Die Schichtdicken lagen unabhängig vom jeweiligen Substitutionsgrad des sRGD-Alginatderivats zwischen 45 – 55 nm. Im Anschluss wurden die beschichteten Substrate mithilfe des in Kapitel 6.1.6 vorgestellten modifizierten LDH-Assays mit humanen Gingivafibroblasten auf ihre Zellverträglichkeit getestet. Die in Abbildung 6—74 illustrierten Ergebnisse zeigen die Zellzahlen auf der jeweiligen Beschichtung gegenüber einer Reintitankontrolle der medizinischen Qualität 4, die auf 100 % normiert wurde. Hierbei verdeutlicht der Zellbewuchs von 50 – 60 % der cRGD-Alginat/αPLL- und sRGD-100/αPLL-Nanopartikelbeschichtungen gegenüber dem Reintitan, dass die initiale Adhäsion der Fibroblasten nach 24 h Inkubationszeit auf diesen Oberflächen deutlich erniedrigt ist. Der Zellbewuchs für die Beschichtungen mit den Formulierungen aus den beiden höher substituierten Alginatderivaten (sRGD-250 und sRGD-500) ist mit etwa 100 % sogar vergleichbar mit dem Reintitan. Gegenüber der Alg/αPLL-Beschichtung, die ein Zellbewuchs

von bis zu 50 % im Vergleich mit der Titankontrolle zeigte (Abbildung 6—71), kann mit den RGD-Modifikationen eine deutlich bessere Adhäsion der Zellen erreicht werden. Die Evaluation der Oberflächen nach 72 h Inkubationszeit, die ein Maß für die Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten ist, zeigt eine deutliche Zunahme der Zellzahlen auf poliertem Reintitan. Demgegenüber ist der Zellbewuchs auf den beschichteten Substraten, unabhängig von der verwendeten Nanopartikelformulierung, mit etwa 20–30 % deutlich geringer. Die Ergebnisse suggerieren, dass im Vergleich zu den Alginat/ α PLL-Beschichtungen keine Optimierung der Zelladhäsion erreicht werden konnte.

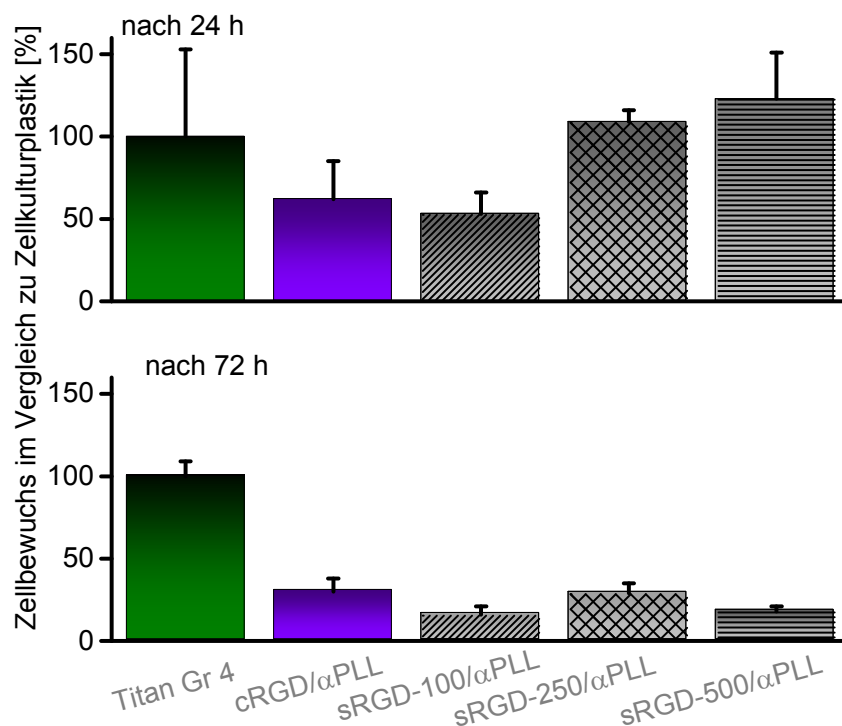


Abbildung 6—74 Ergebnisse des LDH-Tests von humanen Gingivafibroblasten nach 24 und 72 h Inkubationszeit mit unbeschichtetem Reintitan-Substrat (medizinische Qualität 4) als Kontrolle. Die Beschichtungen wurden auf Reintitan durchgeführt (1 min Tauchbeschichtung von PEI-Lösung und 3 min Spray-Coating der RGD-Alginat/ α PLL-Suspensionen, anschließendes Waschen in Wasser). Die Ergebnisse wurden in Relation zu den Werten des Reintitans gesetzt.

Die Substrate wurden durch rasterelektronenmikroskopische Messungen (REM) untersucht, um Rückschlüsse auf die Zellmorphologie zu erhalten. In Abbildung 6—75 sind die REM-Aufnahmen nach 24-stündiger Inkubationszeit dargestellt, die entsprechenden Messungen nach 72 h befinden sich im Anhang 10-16. Sowohl auf dem Reintitansubstrat als auch auf der cRGD-Alginat/ α PLL-Oberfläche konnten konfluente Zellfilme aus langgestreckten Fibroblasten beobachtet werden, die auf eine ausreichende Zelladhäsion und -kompatibilität schließen lassen. Dennoch sind auf den cRGD/ α PLL-Beschichtungen im Vergleich mit der Titankontrolle deutlich weniger Zellen präsent. Die REM-Aufnahmen nach 72 h

Inkubationszeit bekräftigen diese Resultate, sodass mit der Verwendung des cRGD-Alginats eine Zell-verträgliche Oberfläche erzeugt werden konnte, obwohl der Zellbewuchs im Vergleich zum Reintitan signifikant erniedrigt ist. Werden hingegen die Beschichtungen der sRGD-Alginat/ α PLL-Nanopartikel betrachtet, kann zunächst eine Tendenz bei der Gesamtzahl der Zellen festgestellt werden. Die sRGD/ α PLL-Nanopartikelbeschichtung mit dem niedrigsten Substitutionsgrad von 0,26 (cRGD-100) weist den geringsten Zellbewuchs auf, während auf den cRGD-250/ α PLL- und cRGD-500/ α PLL-Beschichtungen mehr Zellen präsent sind. Im Vergleich mit den REM-Aufnahmen der Alg/ α PLL-Beschichtungen aus Abbildung 6—72 können bei allen drei Beschichtungen deutlich mehr Zellen auf der Oberfläche detektiert werden. Die REM-Untersuchungen sind demnach konsistent mit dem LDH-Assay der Beschichtung (siehe Abbildung 6—74).

Zusätzlich fallen die eher rundlichen Zellmorphologien auf, die auf eine unzureichend zellkompatible Oberfläche hinweisen. Dabei kann ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden, da der Anteil der „runden“ Zellen mit steigendem sRGD-Gehalt abnimmt, währenddessen die Anzahl langgestreckter Zellen zunimmt. Somit scheint der Zellbewuchs bei den REM-Aufnahmen in direkter Korrelation mit dem Substitutionsgrad des RGD-Alginats zu stehen. Es wird bei der cRGD-100/ α PLL-Beschichtung vermutet, dass die initiale Adhäsion der humanen Gingivafibroblasten, ähnlich wie bei den Alginat/ α PLL-Beschichtungen, weitgehend unterdrückt ist. Mit der Erhöhung der Konzentration von sRGD-Motiven als „Anker“ für die Zellen konnte zumindest eine gewisse Verbesserung der Zellkompatibilität erreicht werden.

Die Betrachtung der REM-Aufnahmen nach 72 h (siehe Anhang 10-16) liefert für die cRGD/ α PLL-Beschichtung einen Zellfilm, dessen Bewuchs gegenüber der Titankontrolle in Abbildung 6—74 verringert ist. Im Gegensatz dazu können auf allen mit sRGD/ α PLL-beschichteten Substraten bedeutend weniger Zellen detektiert werden, die zudem eine rundliche Morphologie aufweisen. Der bei der Zelladhäsion nach 24 h beobachtete Unterschied zwischen den Substitutionsgraden von sRGD konnte nach 72 h nicht bestätigt werden. Laut HALSTENBERG et al. spielt die Aminosäuresequenz des RGD-Peptids bei der Bewertung der Zellkompatibilität eine wesentlich größere Rolle als die Konzentration. Eine bessere Zelladhäsion und -proliferation konnte bei längeren RGD-Sequenzen beobachtet werden, sodass eine Abhängigkeit von flankierenden Aminosäuren wahrscheinlich ist.²⁵⁵

Zudem müssen strukturelle Unterschiede wie das Molekulargewicht des Alginats bedacht werden, die bereits von SÆTHER et al. publiziert und auf Seite 169 diskutiert wurden.²⁵³

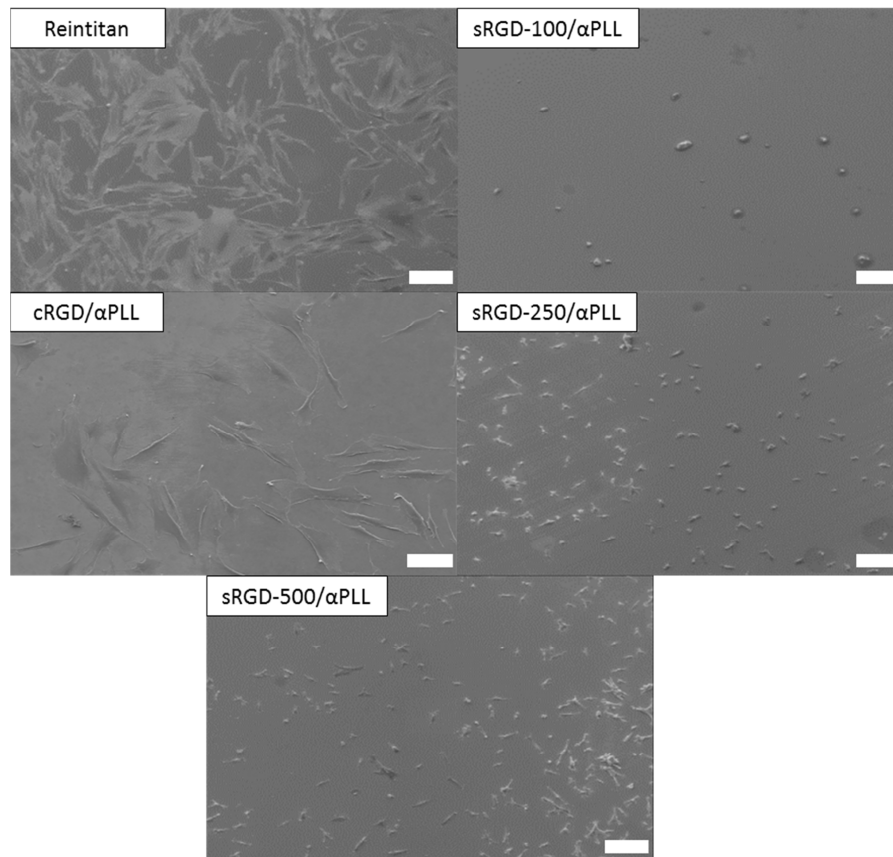


Abbildung 6—75 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem Reintitan (medizinische Qualität 4) und auf cRGD-Alginat/αPLL- und sRGD-Alginat/ αPLL-Beschichtungen des Reintitans nach 24 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Um die Zellkompatibilität der verwendeten RGD-Alginatderivate weitergehend analysieren und vergleichen zu können, müssten für zukünftige Untersuchungen neue Verbindungen synthetisiert werden. Dabei sollte neben unterschiedlichen Alginat-Ausgangsprodukten auch eine Variation der Peptidsequenz in Betracht gezogen werden. Ferner müssten die Parameter der Amidkupplung verändert werden, um zusätzliche Substitutionsgrade herzustellen.

6.3.10 Zusammenfassung

Als Modellsystem wurde ein Nanopartikelsystem bestehend aus dem Biopolymer Natriumalginat in Kombination mit dem kommerziell erhältlichen α-Poly-L-Lysin hergestellt, das mithilfe von Dynamischen Lichtstreuung charakterisiert wurde. Bei den Partikelgrößen- und Zetapotentialbestimmungen konnte eine Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung beobachtet werden. Mithilfe von DLS wurden Stabilitätsmessungen durchgeführt, die keine signifikante Veränderung der Partikelgrößen über einen Zeitraum

von zwei Wochen zeigten. Bei Kryo-REM-Untersuchungen konnte die Bildung von netzartigen Strukturen beobachtet werden, die mit einer Alterung der Proben erklärt wurde. In anschließenden Degradationsstudien konnte die Labilität der Partikel in Anwesenheit der Protease Trypsin gezeigt werden, welche zur Spaltung von α PLL befähigt ist.

Ausgehend von den Alginat/ α PLL-Partikeln wurde ein infektionsrelevantes Freisetzungssystem entwickelt, bei dem als kationische Komponente die Aggrecanase-labilen Peptidsequenzen NITEGE und NVTEGE verwendet wurden. Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung konnten die Alginat/NITEGE- bzw. Alginat/NVTEGE-Systeme in Bezug auf Partikelgröße und Zetapotential charakterisiert werden. In den Kryo-REM-Untersuchungen zeigen sich ähnlich wie bei den Alghinat/ α PLL-Nanopartikeln netzartige Strukturen. Für die Bildung solcher Überstrukturen konnten in den mit Hilfe der DLS durchgeführten Stabilitätsmessungen über zwei Wochen keine Hinweise gefunden werden. Bei Degradationsexperimenten in Gegenwart von Trypsin und Thermolysin konnte hingegen eine Veränderung der Partikelgrößen festgestellt werden, die einen enzymatisch bedingten Abbau vermuten lässt.

Für die Beschichtung der Alginat/Peptid-Systeme wurde eine Methodik ausgearbeitet, bei der die verwendeten Titanplättchen zunächst mit einer Polyethylenimingrundschrift versehen wurden, bevor die Nanopartikelsuspensionen aufgesprüht wurden. Die Charakterisierung der Beschichtungen erfolgte neben ellipsometrischen Messungen auch durch Reflektions-Absorptions-Infrarot-spektroskopische, röntgenphotoelektron-spektroskopische und ToF-SIMS-Untersuchungen. Durch die Koinkubation der beschichteten Substrate konnte eine spezifische Degradation der immobilisierten Schichten in Gegenwart der eingangs beschriebenen Enzyme beobachtet werden.

In Einkapselungstests mit *kommerziellem Interferon- β* (IFN β) konnte für das Alg/NVTEGE-Systeme eine Einlagerungseffizienz von bis zu 30 % nachgewiesen werden. Freisetzungsstudien aus immobilisierten Alg/IFN β /Peptid-Beschichtungen zeigten analog zu dem CS-58/IFN β /TPP-System einen vorzeitigen Release in Zellkulturmedium-Bedingungen. Dieser Befund könnte mit der zu geringen Stabilität der Beschichtungen in Gegenwart von mehrwertigen Ionen zusammenhängen, welche zu einer Reorganisation des Nanopartikelfilms führen könnten. Diese Hypothese müsste durch zukünftige experimentelle Ergebnisse abgesichert werden, indem beispielsweise gezielt der Einfluss mehrwertiger

Kationen wie Calcium- oder Barium-Ionen untersucht werden würde. Zudem wurde die Einlagerung des Proteins eGFPs (enhanced fluorescent green protein) in die Alg/Peptid-Partikel über die Abnahme des Fluoreszenzsignals untersucht. In Inkubationsversuchen bei 37 °C in Reinstwasser konnte aus Aggrecanase-labilen Nanopartikelbeschichtungen eine vorzeitige eGFP-Freisetzung von etwa 5-10 % beobachtet werden, während die Alginat/eGFP/ α PLL-Beschichtungen eine höhere Stabilität aufwiesen. Dieser Befund verdeutlicht die mangelnde Stabilität der Alg/NI(V)TEGE-Beschichtungen, die daher als enzymatisches Freisetzungssystem nicht geeignet sind.

Bei der Untersuchung der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen auf ihre Zellkompatibilität konnten mithilfe der CellTiterBlue- und LDH-Assays keine zelltoxischen Effekte nachgewiesen werden. Die Evaluation der Beschichtungen mit einem modifizierten LDH-Test hingegen zeigte im Vergleich zu der Kontrolle auf poliertem Titan einen deutlich schwächer ausgeprägten Zellbewuchs nach 24 und 72 Stunden. Durch REM-Aufnahmen konnten rundliche Zellmorphologien beobachtet werden, die auf eine schlechte Adhäsion hindeuten, welche vermutlich der Hydrophilie der Beschichtungen geschuldet ist. Um die Zelladhäsion und -proliferation auf den Oberflächen zu verbessern, wurden Nanopartikel mit zwei unterschiedlichen RGD-Alginatderivaten (cRGD und sRGD) hergestellt, bei denen das RGD-Motiv als Zellbindungsdomäne fungieren sollte. Die Evaluation der Zellkompatibilität von RGD-Alginat/ α PLL-Beschichtungen mit dem modifizierten LDH-Assay lieferte im Vergleich zur Titankontrolle einen immer noch deutlich geringeren Zellbewuchs nach 24 und 72 Stunden. Die REM-Aufnahmen deuten hingegen aufgrund der langgestreckten, ausgebreiteten Zellen auf eine ausreichende Adhäsion auf den cRGD-Alginat/ α PLL-Beschichtungen hin. Für das sRGD-Alginat/ α PLL-System mit dem niedrigsten Substitutionsgrad wurden eher rundliche Zellmorphologien beobachtet, die ähnlich wie bei den Alginat/ α PLL-Beschichtungen auf eine zellinkompatible Oberfläche hindeuten. Mit zunehmendem RGD-Substitutionsgrad konnte jedoch ein konfluenten Film aus langgestreckten Zellen beobachtet werden, die auf eine bessere Adhäsion und Proliferation schließen lassen. Durch die Einführung von sRGD-Motiven konnte die Zellkompatibilität der Oberflächen verbessert werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Einbringung von Implantatmaterialien in den menschlichen Körper können aufgrund der Adhäsion von bakteriellen Biofilmen Entzündungsreaktionen auftreten, die zu Funktionsverlust des Implantats und einer notwendigen Revisionsoperation führen können. Im Hinblick auf die damit verbundene Beeinträchtigung des Patienten und den wirtschaftlichen Mehraufwand wurden in dieser Arbeit Nanomaterialien entwickelt, welche einen Wirkstoff als direkte Konsequenz einer Inflammation bzw. Infektion freisetzen können, um dieser pathogenen Situation gezielt entgegen wirken zu können. Als Hauptziele wurden a) die Entwicklung von Enzym-lablen Polysaccharidnanopartikeln, b) die Implementierung als Beschichtungssystem auf Titanoberflächen und c) die Einkapselung und Freisetzung eines Modellwirkstoffs formuliert.

Mit der Präparation von Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP) und Alginat/Peptid-Suspensionen konnten Enzym-labile Polysaccharidnanopartikel entwickelt werden, die durch verschiedene Methoden wie Dynamische Lichtstreuung (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) und Kryo-Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert wurden. Durch den Einsatz von Chitosanderivaten mit Deacetylierungsgraden von 58 % (CS-58) und 72 % (CS-72) konnten Lysozym-labile Nanopartikel in Kombination mit TPP hergestellt werden. Dabei konnte eine Abhängigkeit zwischen dem Deacetylierungsgrad und der Geschwindigkeit bzw. dem Ausmaß der Degradation beobachtet werden. Die Präparation von Alginat-Nanopartikeln wurde zunächst mit dem Crosslinker α -Poly-L-Lysin (α PLL) getestet, bevor die infektionsrelevante Aggrecanase-labile Peptidsequenz NI(V)TEGE eingesetzt wurde. DLS-Untersuchungen zeigten eine ausreichende Stabilität der Alginat/Peptid-Suspensionen. Durch die Zugabe von Enzymen wie Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase konnte eine Partikelgrößenänderung beobachtet werden, die mit der Degradabilität der Nanopartikelkomponenten erklärt wurde. Zusätzlich wurden für die Nanopartikelsuspensionen Toxizitätsuntersuchungen mit humanen Gingivafibroblasten durch CellTiterBlue- und LDH-Tests vorgenommen, die sowohl bei den CS/TPP- als auch bei den Alginat/Peptid-Nanopartikeln eine zytotoxische Wirkung ausschließen.

Die Immobilisierung der Nanopartikel auf Titanmaterialien erfolgte durch eine Sprühbeschichtung der Suspensionen. Die Abscheidung der Nanopartikel auf der Oberfläche wurde mithilfe von ellipsometrischen, rasterelektronenmikroskopischen und Reflektions-

Absorptions-Infrarot-spektroskopischen Messungen (RAIRS) untersucht. Der Abbau der Schichten in Gegenwart von Enzymen wurde in Zusammenhang mit einer spezifischen Degradation der Beschichtungen gedeutet. Dabei konnte bei dem CS/TPP-System eine umso deutlichere Schichtdickenabnahme beobachtet werden, je niedriger der Deacetylierungsgrad des Chitosans ist. Bei den untersuchten Alginat/Peptid-Beschichtungen konnte durch die Zugabe von Enzymen wie Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase eine Enzym-initiierte Schichtdickenabnahme festgestellt werden. Die kontrollierte Degradation der Alginat/Peptid-Beschichtungen wurde durch die unterschiedliche Selektivität der Enzyme bestätigt. Zusätzlich wurden mit humanen Gingivafibroblasten Zelladhäsionsstudien der immobilisierten Nanopartikel mithilfe eines modifizierten LDH-Tests durchgeführt. Die Beschichtungen mit CS-58/TPP- und CS-72/TPP-Nanopartikeln suggerierten zellkompatible Oberflächen. Bei den Alginat/Peptid-Beschichtungen konnten zellabweisende Effekte beobachtet werden, die eine initiale Adhäsion und die Proliferation der humanen Gingivafibroblasten erschweren. Durch die Einführung von RGD-Motiven in das Alginat konnten die Oberflächen bedeutend zellkompatibler gestaltet werden.

Die Ein- und Auslagerung von Modellwirkstoffen wie Interferon- β (IFN β) und „enhanced fluorescent green protein“ (eGFP) wurde untersucht. Die Proteine konnten mit einer Effizienz von etwa 15-25 % in die Partikel eingelagert werden. Die Freisetzung der Wirkstoffe wurde ausgehend von den jeweiligen Nanopartikelbeschichtungen auf Titanoberflächen untersucht. Bei den Untersuchungen in Zellkulturbedingungen konnte eine signifikante Menge an IFN β sowohl aus CS-58/TPP- als auch aus Alginat/NITEGE-Beschichtungen freigesetzt werden. Die Freisetzung von eGFP aus den Beschichtungen wurde fluorometrisch verfolgt und zeigte für die CS-58/TPP- und CS-72/TPP-Systeme eine spontane Freisetzung von 10 bis 20 % des initial eingelagerten Proteins, während aus den Alginat/N(V)TEGE-Beschichtungen etwa 5 – 10 % eGFP unspezifisch freigesetzt werden konnten.

Um diese spontane Freisetzung zu verlangsamen beziehungsweise zu unterdrücken, wurden für das CS/TPP-System exemplarisch zwei Strategien verfolgt. Neben der (i) Substitution des Crosslinkers TPP durch eine diphosphonathaltige Verbindung wurde (ii) die Stabilisierung der Partikel durch kovalente Vernetzung untersucht.

i) Als Grundlage für die gezielte Herstellung von Enzym-labilen Diphosphonsäuren wurden Thiol-En-Produkte aus einer dithiolischen Komponente und einem Allylphosphonat

synthetisiert. Dabei konnte durch die genaue Einstellung des molaren Eduktverhältnisses das Produktverhältnis zugunsten des disubstituierten Produkts optimiert werden. Durch eine Hydrolysereaktion konnten die entsprechenden Natriumsalze der disubstituierten Phosphonsäuren synthetisiert werden, die als Crosslinker zusammen mit dem CS-83 bei der Nanopartikelbildung eingesetzt werden sollten. Trotz der Untersuchung verschiedener Mischungsverhältnisse konnten aber keine monodispersen Nanopartikel hergestellt werden.

ii) Die kovalente Vernetzung der CS/TPP-Partikel erfolgte ausgehend von azid-funktionalisiertem Chitosan, welches durch eine UV-initiierte Reaktion zur Optimierung der Stabilität beitragen sollte. In Degradationsstudien konnte die hervorragende Stabilität von vernetzten CSAzid/TPP-Beschichtungen in Gegenwart von Enzymlösungen nachgewiesen werden. Jedoch konnte keine Freisetzung des Wirkstoffs IFN β erreicht werden, da vermutlich eine kovalente Anbindung des Proteins erfolgt.

In zukünftigen Untersuchungen müsste die Wirkstoffbeladung mit IFN β und eGFP erhöht werden, indem die hydrophoben Proteine während des Verkapselungsprozesses stabilisiert werden.²⁰³ Des Weiteren sollte generell überlegt werden, ob die getroffene Wirkstoffauswahl, ausgehend von den Ergebnissen der BMP-2-Einkapselung, sinnvoll war. Einerseits wurden mit IFN β und eGFP zwei etablierte Proteine ausgewählt, welche sich sehr sensitiv nachweisen lassen. Andererseits muss jedoch bedacht werden, dass sich die Eigenschaften der Proteine untereinander grundlegend unterscheiden und daher keine Extrapolation für die Eignung als potentiellen Wirkstoff zulassen. Durch die Verwendung von klinisch relevanteren Wirkstoffen könnten die Nanopartikel entsprechend anwendungsnäher gestaltet werden und eine Übertragung in die Praxis erleichtern.

Des Weiteren stellt die noch nicht ausreichende Stabilität der Materialien für einen möglichen Einsatz in der gezielten Wirkstoffapplikation ein ernstes Problem dar. Eine Stabilitätsoptimierung der Materialien könnte zukünftig beispielsweise durch kovalente Anbindung der Nanopartikelkomponenten erreicht werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Wirkstoff während der Vernetzungsreaktion aktiv bleibt.

In einem weiteren möglichen Ansatz könnte zudem der Wirkstoff direkt an ein Enzym-responsives Peptid gebunden werden und mithilfe einer Amidkupplung an Nanopartikel kovalent angelagert werden. Als Grundlage für die Peptidmodifizierung könnte beispielsweise der von RODRIGUEZ et al. vorgestellte Ansatz verwendet werden, indem eine

Peptidsequenz mit zehn Aminosäuren mit dem Antibiotikum Levofloxacin funktionalisiert wurde. Die antibakterielle Effektivität von Levofloxacin wurde durch die Kupplungsreaktion nicht nachteilig beeinflusst.²⁵⁶ Das Wirkstoff-Peptid-Konjugat kann anschließend an stabile Nanopartikel gebunden werden, welche beispielsweise für eine zielgerichtete Wirkstofffreisetzung oder für die Immobilisierung auf Implantatoberflächen dienen können.²⁵⁷ Durch die kovalente Bindung von Wirkstoffen an Peptide könnte die Wirkstoffapplikation noch gezielter erfolgen, indem mit der Variation der Peptidsequenz spezifische Enzyme adressiert werden könnten.

8. Experimenteller Teil

8.1 Materialien

8.1.1 verwendete Chemikalien

Tabelle 8-1 Chemikalien

Reagenz	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aggrecanase-labile Peptidsequenz (human) NITEGEARGSV	-	HZI
Aggrecanase-labile Peptidsequenz (murin) NVTEGEALGSV	-	HZI
Alginat-Lyase	-	SIGMA-ALDRICH
Allylbromid	puriss	TCI
4-Azidobenzoesäure	97 %	TCI
Chitosan (190-310 kDa, 75-85 % DDA)	-	SIGMA-ALDRICH
2,4,6-Collidin	99 %	ALFA-AESAR
deuteriertes Chloroform	99,8 %	DEUTERO
Deuteriumchlorid (36-38 % in D ₂ O)	99,5 %	DEUTERO
Deuteriumoxid	99,8 %	DEUTERO
2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon	98 %	TCI
4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid	> 96 %	SIGMA-ALDRICH
Dinatriumhydrogenphosphat	p.a.	FLUKA
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	99,5 %	SIGMA-ALDRICH
Essigsäure	100 %	SIGMA-ALDRICH
Essigsäureanhydrid	99 %	SIGMA-ALDRICH
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	> 98 %	SIGMA-ALDRICH
2,2-Ethylendioxydiethanthiol	95 %	SIGMA-ALDRICH
1,6-Hexandithiol	97 %	ALFA-AESAR

N-Hydroxysuccinimid	98 %	ACROS
Lysozym (chicken egg white)	-	SERVA
Rekombinantes Maus-Interferon- β (carrier-frei)	> 95 %	PBL ASSAY SCIENCE
Kaliumchlorid	> 99 %	FLUKA
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	FISHER SCIENTIFIC
Natriumalginat	-	SIGMA-ALDRICH
GRGDSP-Alginat (hoher Guluronsäure- Anteil)	-	NOVAMATRIX
MES-Puffer	99,5 %	SIGMA-ALDRICH
Natriumchlorid	99,5 %	VWR
Natriumhydroxid	> 99 %	VWR
Natrium-3-Trimethylsilyl-1-propansulfonat	97 %	SIGMA-ALDRICH
Phosphatpuffer-Pellets (pH 7,4)	-	VWR
Pentaerythritoltetrakis(3- mercaptopropionat)	> 95 %	SIGMA-ALDRICH
Polyethylenimin (in Wasser)	50 %	CHEMPUR
α -Poly-L-Lysin (1,6 kDa)	90 – 100 %	ALAMANDA POLYMERS
GRGDSP-Peptidsequenz	> 97 %	SIGMA-ALDRICH
Salzsäure	37 %	SIGMA-ALDRICH
Tetramethylsilan	99,5 %	FLUKA
Thermolysin	-	SIGMA-ALDRICH
Triethylphosphit	97 %	FLUKA
Trimethylsilylbromid	97 %	SIGMA-ALDRICH
Trypsin	-	SIGMA-ALDRICH
Zellkulturmedium (Dulbecco's modified eagle medium)	-	BIOCHROM AG

8.1.2 verwendete Lösungsmittel

Tabelle 8-2

Lösungsmittel		
Lösungsmittel	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aceton	HPLC (100 %)	VWR
Dichlormethan	HPLC (99,8 %)	VWR
Diethylether	HPLC (99,5 %)	VWR
Dimethylformamid	HPLC (99,9 %)*	VWR
Ethylacetat	HPLC (99,8 %)	VWR
Methanol	HPLC (100 %)	VWR
Reinstwasser	zweifach deionisiert	-
Toluol	HPLC (99,8 %)*	VWR

* zusätzliche Trocknung durch SPS-Anlage SPS 800 von MBRAUN (Garching, Deutschland)

8.1.3 Titansubstrate

Für die durchgeführten Beschichtungsversuche wurden zunächst quadratische Titansubstrate (Abmessungen = $1 \times 1 \text{ cm}^2$) von GOODFELLOW mit einer Dicke von etwa 1 mm eingesetzt, die aus der Titanlegierung TiAl6V4 (medizinische Qualität 5) bestehen. Im Laufe der Promotion wurde das Beschichtungsmaterial gewechselt, indem fortan kreisrunde Reintitanplättchen (medizinische Qualität 4) der Firma BRASSLER (Lemgo, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1,1 cm verwendet wurden.

Die Titansubstrate wurden auf einem Poliergerät des Typs Phoenix 4000 der Firma BUEHLER (Esslingen, Deutschland) geschliffen und poliert. In dem Schleifprozess wurden die Plättchen unter Verwendung von Siliziumcarbid-Nassschleifpapier des Typs P 800, P 1200 und P 2500 behandelt. Das Polieren der Substrate erfolgte mit kolloidaler Siliziumdioxid-Feinstpoliersuspension des Typs Mastermet und Mastermet 2 der Firma BUEHLER auf einem ChemoMet Poliertuch. Anschließend wurden die Plättchen im Ultraschallbad für je

10 Minuten mit destilliertem Dichlormethan, Aceton, Methanol und Reinstwasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurden die polierten Substrate in Petrischalen im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden sie bei 75 W für 10 Minuten in einem Plasma-Gerät des Typs Femto der Firma DIENER mit Luft als Betriebsgas behandelt, bevor am Ellipsometer die optischen Referenzeigenschaften ermittelt wurden.

8.2 Polymercharakterisierung

8.2.1 NMR-Spektroskopie

Sämtliche ^1H -NMR-Spektren der Polymere wurden auf einem AV III-400-Spektrometer der Firma BRUKER (Billerica, USA) mit einer magnetischen Feldstärke von 9,4 T und 400 MHz gemessen. Als deuterierte Lösungsmittel wurden D_2O und DCl verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der 1D NMR Processor Software Version 12.01 von ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT (Toronto, Kanada).

8.2.2 FTIR-Spektroskopie

FT-Infrarotspektroskopie der Polymere wurde an einem Spektrometer der Firma BRUKER (Billerica, USA) mit einem DTGS-Detektor (Deuteriertes Triglycinsulfat) durchgeführt. Hintergrundmessungen wurden zunächst an reinem KBr im Bereich von $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, bei 10 KHz und 32 Scans pro Probe durchgeführt, bevor jede Verbindungen auf einem einzelnen KBr-Pressling ($4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, 10 KHz und 64 Scans) analysiert wurden. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der Software OPUS (Version 4.0.24) der Firma BRUKER.

8.2.3 Elementaranalyse (EA)

Die Elementaranalysen wurden im analytischen Labor des Instituts für medizinische und pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig an einem Gerät des Typs EA 1112 der Firma THERMO QUEST ITALIA S.P.A. (Rodano, Italien) gemessen.

8.2.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC-Messungen wurden an einer wässrigen GPC mit einem Suprema-Säulensatz (Vorsäule $10 \mu\text{m}$; 100 \AA Säule $10 \mu\text{m}$; 10.000 \AA Säule $10 \mu\text{m}$) der Firma PSS (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Als Eluent wurde ein Phosphat-Puffer (0,02 M; pH 7,4) mit 0,1 M NaCl und 0,05 % NaN_3 verwendet, der durch eine $0,2 \mu\text{m}$ Membran filtriert wurde. Die Messungen wurden bei 40°C , mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Als

Injektionsvolumen wurden 100 μL gewählt, die Probenkonzentration betrug entweder 1 oder 2 mg/mL. Das Detektorsystem bestand aus einem Lichtstreuendetektor Dawn DSP ($\lambda=690\text{ nm}$, 18 Winkel) der Firma WYATT TECHNOLOGY EUROPE (Dernbach, Deutschland) und einem Brechungsindex-Detektor RI-101 der Firma SHODEX (München, Deutschland). Die Datenaufnahme und –auswertung wurde über die WinGPC UniChrom Software (Version 8.1) von PSS durchgeführt.

8.3 Nanopartikelcharakterisierung

8.3.1 Partikelgröße

Die Charakterisierung der Nanopartikelsuspensionen hinsichtlich ihrer Größe erfolgte in Probentripellets mit einem Zetasizer Nano ZS der Firma MALVEN INSTRUMENTS (Herrenberg, Deutschland). Für die Bestimmung der Partikelgrößen wurden Einwegküvetten (DTS0012) verwendet. Sämtliche Standardmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt, während für Partikeldegradationen eine Temperierung bei 37 °C gewählt wurde. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der MALVERN Zetasizer Software Version 7.03.

8.3.2 Zetapotential

Die Charakterisierung der Nanopartikelsuspensionen hinsichtlich ihres Zetapotentials erfolgte in Probentripellets mit einem Zetasizer Nano ZS der Firma MALVEN INSTRUMENTS (Herrenberg, Deutschland). Für die Bestimmung der Zetapotentiale wurden Einwegküvetten (DTS1060C) verwendet. Sämtliche Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der MALVERN Zetasizer Software Version 7.03.

8.3.3 Kryo-REM

Sämtliche Kryo-REM-Untersuchungen der Nanopartikelsuspensionen wurden von Dr. Brigitte Tiersch am Institut für Chemie der Universität Potsdam an einem Gerät des Typs S-4800 der Firma HITACHI (Chiyode, Japan) durchgeführt.

8.3.4 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

Sämtliche AF4-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Boye am Institut für Polymerforschung (Dresden) mit einem Gerät des Typs Eclipse 3 der Firma WYATT TECHNOLOGY EUROPE (Dernbach, Deutschland) in Kombination mit einem AGILENT Pumpensystem (Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten bei 25 °C in einem langen Kanal aus regenerierter Cellulose (10 kDa) mit einer Höhe von 350 μm . Als Eluent wurde ein PBS-Puffer

mit 0,2 % NaN_3 gewählt, die Flussrate betrug 0,2 mL/min. Das Detektorsystem von WYATT TECHNOLOGY EUROPE bestand aus einem Lichtstreuendetektor Dawn Helios-II mit einer Wellenlänge von 690 nm (18 Winkel) und einem Brechungsindex-Detektor Optilab T-rEX mit einer Wellenlänge von 690 nm.

8.4 Beschichtungsmethode und -charakterisierung

8.4.1 Tauchbeschichtung von PEI

Für die Alginat/Peptid-Nanopartikelbeschichtungen mussten die Titansubstrate mit einer Grundsicht aus Polyethylenimin (PEI) versehen werden. Hierbei wurden die polierten Plättchen in einer 5 %-igen (w/w) PEI-Lösung für eine Minute getaucht, bevor sie sukzessive in Reinstwasser geschwenkt und getrocknet wurden.

8.4.2 Sprühbeschichtung der Titansubstrate

Die Beschichtungen erfolgten auf polierten Titansubstraten über eine manuelle Sprühbeschichtung mit einer Airbrush des Typs Aztek A470 von TESTORS (Rockford, USA). Dafür wurden die Nanopartikellösungen für drei Minuten mit einem mittleren Volumenstrom von 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf die Titanoberfläche gesprüht. Anschließend wurden die Substrate in Reinstwasser geschwenkt und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Für den Beschichtungsprozess wurden die Titanplättchen an den Rändern in eine Schieblehre eingespannt, um eine vollständige Beschichtung der Oberfläche zu erreichen.

8.4.3 Sprühbeschichtung der Siliziumplättchen

Die Beschichtungen erfolgten auf Siliziumplättchen über eine manuelle Sprühbeschichtung mit einer Airbrush des Typs Aztek A470 von TESTORS (Rockford, USA). Dafür wurden kreisrunde, „singleside polished“ Siliziumwafer der Dicke 675 μm und einem Durchmesser von 150 mm der Firma SI-MAT (Kaufering, Deutschland) auf Rechtecke der Größe 20x10 mm gebrochen. Für die Beschichtung wurden die Nanopartikellösungen für drei Minuten mit einem mittleren Volumenstrom von 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf die Siliziumoberfläche gesprüht. Anschließend wurden die Substrate in Reinstwasser geschwenkt und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Für den Beschichtungsprozess wurden die Siliziumplättchen an den Rändern in eine Schieblehre eingespannt, um eine vollständige Beschichtung der Oberfläche zu erreichen.

8.4.4 Ellipsometrie

Für die Bestimmung der optischen Eigenschaften der Beschichtungen wurde ein Multiskop von OPTREL (Sinzing, Deutschland) im Nullellipsometriemodus verwendet. Die Messungen wurden im x,y-Modus bei einem Winkel von 70° durchgeführt, indem die Oberfläche jeder Probe in einer 4 x 4-Matrix mit 16 Messpunkten gescannt wurde. Die erhaltenen Messpunkte dienten zur Bestimmung der optischen Konstanten und der Schichtdicken. Mithilfe der von OPTREL bereitgestellten Elli Software Version 3.2 wurde die Auswertung der Messungen durchgeführt.

8.4.5 Reflektions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS)

Die FTIR-RAIRS-Untersuchungen der Beschichtungen wurden an einem FTIR-Spektrometer des Typs Equinox 55 der Firma BRUKER (Billerica, USA) unter Verwendung eines speziellen RAIRS-Moduls durchgeführt, bei dem der Infrarotstrahl unter einem Winkel von 80°, relativ zum Lot, von der Probe in den MCT-Detektor (Quecksilber-Cadmium-Tellurid) reflektiert wird. Hintergrundmessungen wurden zunächst von unbeschichteten Substraten im Bereich von $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, bei 10 KHz und 32 Scans pro Probe durchgeführt, bevor jedes beschichtete Plättchen einzeln ($4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, 10 KHz und 64 Scans) analysiert wurde. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der Software OPUS (Version 4.0.24) der Firma BRUKER.

8.4.6 Quarz-Kristallmikrowaage (QCM)

Sämtliche QCM-Messungen zur Evaluation der Beschichtungsstabilität wurden auf einem Gerät der Firma Q-SENSE (Göteborg, Schweden) durchgeführt. Als Substrate wurden mit dünnen Titanschichten bedampfte Quarzkristalle der Firma Q-SENSE verwendet, die für 10 min mit einem Luftplasma (75 W) gereinigt wurden. Bei jeder Messung wurde die Messzelle initial mit Reinstwasser gespült bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Anschließend wurde Reinstwasser durch die jeweilige Enzymlösung ersetzt. Die Messdaten wurden als Funktion der Zeit durch die Änderung der Frequenz und der Dissipation mit dem Programm QSoft401 der Firma Q-SENSE aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Qtools (Version 3.0.17.560) der Firma Q-SENSE.

8.4.7 REM

Die REM-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Peter Pfeiffer am Institut für Werkstoffe der TU Braunschweig an einem Rasterelektronenmikroskop des Typs LEO 1550 von CARL ZEISS (Jena, Deutschland) durchgeführt. Für die Messungen wurden die Titanplättchen mit Silberleitlack auf einem Träger fixiert.

8.4.8 XPS

Die XPS-Messungen wurden im Rahmen einer Gerätevorführung auf einem Röntgen-Photoelektronen-Spektrometer des Typs Axis Supra der Firma KRATOS ANALYTICAL (Manchester, Großbritannien) durchgeführt. Von den Proben wurden neben einem Übersichtspektrum C 1s-, O 1s-, N 1s- und Ti 2p-Spektren aufgenommen. Bei einer Leistung von 300 W wurde unter Verwendung eines Ladungsneutralisators eine Fläche von 700 µm x 300 µm analysiert. Die Messzeit betrug 2 Minuten.

8.4.9 ToF-SIMS

Die Messungen wurden im Rahmen einer Gerätevorführung auf einem Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometer des Typs TOF.SIMS⁵ der Firma ION-TOF (Münster, Deutschland) vorgenommen. Die Analysen wurden als Oberflächenabbildung (Imaging) der Beschichtungen durchgeführt, bei denen eine Bi₃⁺-Ionenquelle mit einer Primärionenenergie von 30 keV zum Einsatz kam. Die Charaktisierung erfolgte im „fast imaging“-Analysemodus mit einem Analysestrom von 0,3 pA.

8.4.10 SEEC

Die SEEC-Messungen wurden im Rahmen von Testmessungen von Herrn Nicolas Medard bei der Firma NANOLANE (Le Mans, Frankreich) auf einem Gerät des Typs Sarfus HR Station durchgeführt.

8.5 CS-83/TPP-Nanopartikel

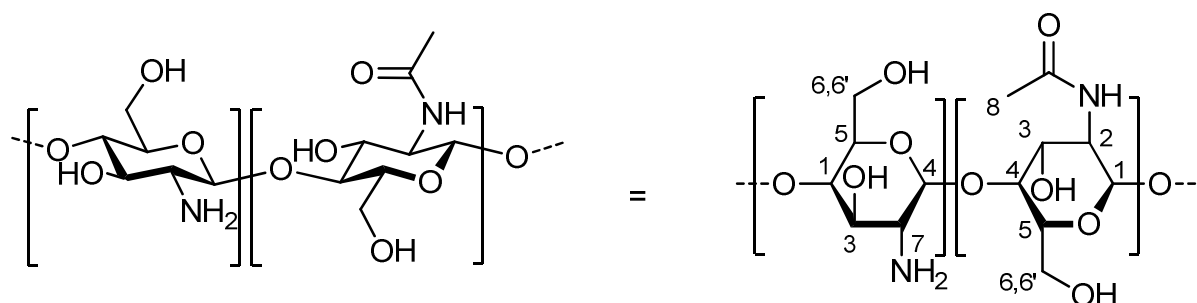
8.5.1 Aufreinigung von Chitosan (CS-83)

Für die Aufreinigung von kommerziell erhältlichem Chitosan wurde eine Methode von GAN et al. verwendet, bei der 1 g des Biopolymers (medium MW, 190-310 kDa, 75-85 % DDA) in 10 mL 1 M Natriumhydroxidlösung gegeben wurde.¹¹⁷ Die Suspension wurde bei 70 °C für zwei Stunden gerührt, bevor das Chitosan abfiltriert, mit entionisiertem Wasser gewaschen und in 1 %-iger AcOH gelöst wurde. Anschließend wurde die Chitosanlösung erneut filtriert

und gegen 0,1 M NaCl-Lösung sowie entionisiertes Wasser dialysiert (12-14 kDa MW cutoff). Nach der Lyophilisierung der Lösung wurde das Chitosan mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in einer Mischung aus $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ in einem Verhältnis von 500:1 analysiert. Der Deacetylierungsgrad (DDA) der Probe (CS-83) wurde anhand der Integrale des ^1H -NMR-Spektrums auf 83 % berechnet.

$$DDA = 1 - \frac{\text{Integral}_{\text{H8}} \cdot 2}{\text{Integral}_{\text{H2-H6}} + \text{Integral}_{\text{H7}}}$$

^1H -NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ 500:1) δ [ppm] = 5,00-4,64 (m, HOD und 1xCH, H_1); 4,27-3,49 (m, 5-6xCH bzw. CH_2 , H_{2-6}); 3,37-3,04 (s, 0-1 CH, H_7); 2,24-1,99 (s, 1x CH_3 , H_8).



Zusätzlich wurde aufgereinigtes Chitosan als KBr-Pressling mittels FT-Infrarotspektroskopie untersucht.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3352 (w); 2986 (w); 1630 (w); 1508 (w); 1244 (m); 1063 (s); 1020 (s); 953 (s); 864 (m).

8.5.2 Herstellung von CS-72 durch Acetylierung von CS-83

Die Acetylierung des aufgereinigten CS-83, siehe Kapitel 8.5.1, wurde nach einer Methode von FREIER et al. durchgeführt. Dafür wurde eine 5 mg/mL-konzentrierte CS-83-Lösung in 1 %-iger (v/v) AcOH hergestellt. Danach wurde das Reaktionsvolumen durch Zugabe von destilliertem EtOH verdoppelt, bevor Essigsäureanhydrid in einem Molverhältnis von 0,18 zu Glucosamin hinzugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 18 h gerührt, gegen 0,1 M NaCl-Lösung und entionisiertem Wasser dialysiert (10 kDa MW cutoff), filtriert und lyophilisiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in einer Mischung aus $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ in einem Verhältnis von 500:1. Der Deacetylierungsgrad (DDA) der Probe (CS-72) wurde anhand der Integrale des ^1H -NMR-Spektrums auf 72 % berechnet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 500:1) δ [ppm] = 5,02-4,66 (m, HOD und 1xCH, H_1); 4,19-3,38 (m, 5-6xCH bzw. CH_2 , H_{2-6}); 3,14-2,79 (s, 0-1 CH, H_7); 2,15-1,97 (s, 1x CH_3 , H_8).

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3352 (w); 2983 (w); 1650 (w); 1552 (w); 1380 (m); 1073 (s); 1029 (s); 655 (m).

8.5.3 Herstellung von CS-58 durch Acetylierung von CS-83

Die Acetylierung des aufgereinigten CS-83, siehe Kapitel 8.5.1, wurde nach einer Methode von FREIER et al. durchgeführt. Dafür wurde eine 5 mg/mL-konzentrierte CS-83-Lösung in 1 %iger (v/v) AcOH hergestellt. Danach wurde das Reaktionsvolumen durch Zugabe von destilliertem EtOH verdoppelt, bevor Essigsäureanhydrid in einem Molverhältnis von 0,32 zu Glucosamin hinzugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 18 h gerührt, gegen 0,1 M NaCl-Lösung und entionisiertem Wasser dialysiert (10 kDa MW cutoff), filtriert und lyophilisiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in einer Mischung aus $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ in einem Verhältnis von 500:1. Der Deacetylierungsgrad (DDA) der Probe (CS-58) wurde anhand der Integrale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums auf 58 % berechnet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 500:1) δ [ppm] = 5,00-4,64 (m, HOD und 1xCH, H_1); 4,24-3,40 (m, 5-6xCH bzw. CH_2 , H_{2-6}); 3,36-2,98 (s, 0-1 CH, H_7); 2,17-1,94 (s, 1x CH_3 , H_8).

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3352 (m); 2924 (w); 1644 (m); 1556 (m); 1380 (m); 1068 (s); 1020 (s); 634 (m).

8.5.4 Präparation von CS/TPP-Nanopartikeln

Von den Chitosanderivaten CS-83, CS-72 und CS-58 sowie TPP wurden 1 mg/mL-konzentrierte Lösungen in 0,1 % (v/v) AcOH hergestellt. Anschließend wurde die CS-Lösungen in einem 3:1-Volumenverhältnis zu der TPP-Lösung gegeben und mit einer Eppendorfpipette durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren durchmischt. Die Charakterisierung der erhaltenen Nanopartikel erfolgte im Anschluss der Herstellung über Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS). Ausgewählte Proben wurden zudem per Kryo-REM analysiert (siehe Kapitel 8.3).

8.5.5 Stabilität der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen

1 mL der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen (3:1, jeweils 1 mg/mL in 0,1 % AcOH) wurde in eine Einwegküvette gegeben. Das Degradationsverhalten wurde anschließend über Dynamische Lichtstreuemessungen (DLS) mithilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C verfolgt.

8.5.6 Degradation der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen

990 µL der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen (3:1, jeweils 1 mg/mL in 0,1 % AcOH) wurden in eine Einwegküvette gegeben und bei 37 °C inkubiert. In der Folge wurden 10 µL einer 150 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung zugefügt, um eine finale Lysozymkonzentration von 1,5 µg/mL zu erhalten. Das Degradationsverhalten wurde über Dynamische Lichtstreuemessungen (DLS) mithilfe eines Zetasizer Nano ZS bei 37 °C verfolgt.

8.5.7 Beschichtung von Titansubstraten mit CS/TPP-Nanopartikeln

Die Beschichtung von Titansubstraten mit den CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen (3:1, jeweils 1 mg/mL in 0,1 % AcOH) wurde über eine 3-minütige Sprühbeschichtung gemäß Kapitel 8.4.2 durchgeführt. Dafür wurden die Nanopartikelsuspensionen für drei Minuten mit einem mittleren Volumenstrom von 7 µL/min auf die Titanoberfläche gesprüht. Anschließend wurden die Substrate in Reinstwasser geschwenkt und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Für den Beschichtungsprozess wurden die Titanplättchen an den Rändern in eine Schieblehre eingespannt, um eine vollständige Beschichtung der Oberfläche zu erreichen.

8.5.8 Stabilität der CS/TPP-Beschichtungen

Die beschichteten Titansubstrate wurden in Triplikaten in je 1 mL Reinstwasser in einem 24-Well-Plate platziert und bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Zeitintervallen wurden die Plättchen aus der Lösung entnommen, im N₂-Strom getrocknet und am Ellipsometer vermessen (siehe Kapitel 8.4.4). Im Anschluss wurden die Substrate erneut in jeweils 1 mL frischem Reinstwasser bei 37 °C gelagert.

Für Degradationsstudien in Gegenwart von Lysozym wurden die beschichteten Titanplättchen in Triplikaten in 990 µL Reinstwasser gelegt, bevor 10 µL einer 150 µg/mL-konzentrierten Lysozymlösung für eine Endkonzentration von 1,5 µg/mL zugefügt wurden. Nach definierten Zeitabschnitten wurden die Substrate aus der Lösung entnommen, mit N₂

getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert. Danach wurden die Substrate erneut in jeweils 1 mL frischem Medium bei 37 °C gelagert.

8.5.9 Einkapselung von IFN β in CS/TPP-Nanopartikel

Für die Nanopartikelformulierungen mit IFN β wurde zunächst das entsprechende Volumen der Polysaccharidkomponente (1 mg/mL in 0,1 % AcOH für CS) vorgelegt. Anschließend wurde das Protein IFN β (10700 U/mL für *nicht-kommerzielles IFN β* ; 5.000 U/mL für *kommerzielles IFN β*) hinzugegeben und mithilfe einer Eppendorfpipette vermischt. Danach wurde das entsprechende Volumen des jeweiligen Crosslinkers (1 mg/mL in 0,1 % AcOH für TPP) hinzugefügt, um für CS/TPP ein Volumenverhältnis von 3:1 zu erhalten. Durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Suspensionen mit einer Eppendorfpipette wurde eine homogene Durchmischung der Proben erreicht.

8.5.10 Freisetzung von IFN β aus CS/TPP-Nanopartikeln

Mx2Luc2-Zellen wurden in 24-Well-Platten mit 50.000 Zellen pro Well in DMEM-Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde das DMEM-Medium entfernt, bevor IFN β in Medium (für Konzentrationsreihe) bzw. die Nanopartikel mit IFN β (für die Messung der Einkapselungseffizienz) hinzugegeben wurden. Die behandelten Zellen wurden erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde aus den Wells der Überstand entfernt, mit PBS gewaschen und mit 125 μ L Reporterlysepuffer (RLB) versetzt. Die 24-Well-Plates wurden in einem Tiefkühlschrank bei -80°C für mindestens 30 Minuten aufbewahrt. Im Anschluss wurden in einem entsprechenden Röhrchen 20 μ L von jedem Well in 100 μ L einer Luciferase-Lösung hineinpipettiert und mithilfe eines Luminometers des Typs Lumat LB 9507 der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES (Bad Wildbad, Deutschland) vermessen.

8.5.11 Einkapselung von eGFP in CS/TPP-Nanopartikel

Für die Nanopartikelformulierungen mit eGFP wurde zunächst das entsprechende Volumen der Polysaccharidkomponente (1 mg/mL in 0,1 % AcOH für CS) vorgelegt. Anschließend wurden $1,47 \times 10^{-3}$ μ mol/mL eGFP (Ausgangskonzentration 0,049 μ mol/mL) hinzugegeben und mithilfe einer Eppendorfpipette vermischt. Danach wurde das entsprechende Volumen des jeweiligen Crosslinkers (1 mg/mL in 0,1 % AcOH für TPP) hinzugefügt, um für CS/TPP ein Volumenverhältnis von 3:1 zu erhalten. Durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Suspensionen mit einer Eppendorfpipette wurde eine homogene Durchmischung der Proben

erreicht. Optional wurde für die CS/eGFP/TPP-Formulierungen ein Zentrifugationsschritt eingeführt (15 min, 16.800 Umdrehungen pro Minute). Als Kontrollen wurden CS/TPP-Suspensionen und $1,47 \times 10^{-3} \mu\text{mol/mL}$ freies eGFP in 0,1 % AcOH verwendet. Für die Fluoreszenz-Untersuchungen wurden die Proben 1:4 in Wasser verdünnt und an einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät des Typs TriStar² Multimode Reader LB 942 der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES (Bad Wildbad, Deutschland) vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der „ICE Software for Instrument Control and Evaluation“ der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Der Rückstand der zentrifugierten Proben wurde zunächst mit insgesamt zweimal 100 μL Wasser gewaschen, bevor eine Resuspendierung mit 100 μL Wasser erfolgte. Anschließend wurden die Suspensionen am Fluoreszenz-Plattenlesegerät vermessen.

8.5.12 Freisetzung von eGFP aus CS/TPP-Beschichtungen

Die Herstellung der CS/eGFP/TPP-Nanopartikelformulierungen erfolgte analog zu Kapitel 8.5.11. Anschließend wurden für jede Formulierung jeweils drei Reintitanplättchen (medizinische Qualität 4) für 10 min mit einem Luftplasma (75 W) gereinigt und für 3 min mit einem mittleren Volumenstrom von 7 $\mu\text{L/min}$ mit den Nanopartikelsuspensionen beschichtet. Danach wurden die Substrate durch Schwenken in Reinstwasser gewaschen und in einem 24-Well-Plate bei 37 °C in 1,5 mL Reinstwasser inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten (30 min, 2 und 24 h) wurden pro Well jeweils zwei Aliquote à 100 μL entnommen und am Fluoreszenz-Plattenlesegerät vermessen. Zusätzlich wurden zwei identische Konzentrationsreihen von eGFP ($2,94 \times 10^{-5} \mu\text{mol/mL}$, $1,47 \times 10^{-5} \mu\text{mol/mL}$, $7,35 \times 10^{-6} \mu\text{mol/mL}$ und $3,675 \times 10^{-6} \mu\text{mol/mL}$) erstellt und zu den gegebenen Zeitpunkten jeweils zweifach vermessen.

8.6 Alginat-Peptid-Nanopartikel

8.6.1 Aufreinigung von Alginat

Für die Aufreinigung von kommerziell erhältlichem Natriumalginat wurde eine Methode von PROKOP et al. modifiziert, indem 2 g des Biopolymers in 30 mL Wasser gelöst wurden und für insgesamt drei Tage gegen 0,1 M NaCl-Lösung und entionisiertem Wasser dialysiert wurde (10 kDa MW cutoff).²³¹ Danach wurde die Lösung mit 0,5 g Aktivkohle pro Gramm Alginat versetzt und über Nacht gerührt. Am Folgetag wurde die Aktivkohle abfiltriert und das Filtrat gefriergetrocknet und bei -20 °C gelagert. Die Charakterisierung des aufgereinigten Alginats

hinsichtlich des Uronsäureverhältnisses (M/G-Verhältnis) und der Blockstrukturen erfolgte durch ^1H -NMR-spektroskopische Messungen bei 353 Kelvin, indem die in Abbildung 6—39 gezeigte Integraalauswertung mit folgenden Gleichungen vorgenommen wurde.²¹⁶

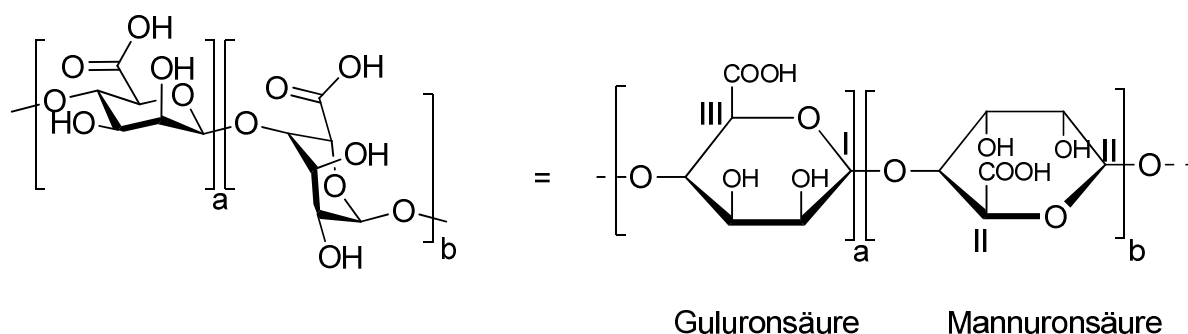
^1H -NMR (400 MHz, D_2O bei 353 K) δ [ppm] = 5,10 (s, 1xCH, G-1 = A_I); 4,69-4,78 (m, A_{II}); 4,40 (s, 1xCH, A_{III}); 3,50-4,25 (m).

$$F_G = \frac{A_I}{A_{II} + A_{III}} = 1 - F_M = F_{GG} + F_{GM}$$

$$F_{GG} = \frac{A_{III}}{A_{II} + A_{III}}$$

$$F_M = F_{MM} + F_{MG}$$

$$\frac{M}{G} = \frac{1 - F_G}{F_G}$$



Daraus konnte folgende Zusammensetzung des Natriumalginats berechnet werden.

Tabelle 8-3 Zusammensetzung des Natriumalginats durch Auswertung der Integrale aus dem bei 353 K aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum (in D_2O + DSS).

F_G	F_M	M/G	F_{MM}	F_{GG}	F_{GM}	F_{MG}
0,44	0,56	1,3	0,38	0,26	0,18	0,18

Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde das aufgereinigte Natriumalginat mit einer Konzentration von 2 mg/mL in einem Phosphatpuffer (SØRENSEN-Puffer) angesetzt. Anschließend GPC-Messungen ergaben ein Zahlenmittel von $M_n = 72 \pm 1$ kDa.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3325 (m); 1596 (s); 1407 (m); 1297 (w); 1088 (w); 1028 (s); 625 (s).

8.6.2 Präparation von Alginat/ α PLL-Nanopartikeln

Von Natriumalginat und α PLL wurden 1 mg/mL-konzentrierte Lösungen in Reinstwasser hergestellt. Anschließend wurde die Alginat-Lösung in einem 4:1-Volumenverhältnis zu der α PLL-Lösung gegeben und mit einer Eppendorfpipette durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren durchmischt. Die Charakterisierung der erhaltenen Nanopartikel erfolgte im Anschluss der Herstellung über Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS). Ausgewählte Proben wurden zudem per Kryo-REM analysiert (siehe Kapitel 6.3.2).

8.6.3 Präparation von Alginat/NITEGE- und Alginat/NVTEGE-Nanopartikeln

Von Natriumalginat, NITEGE und NVTEGE wurden 1 mg/mL-konzentrierte Lösungen in Reinstwasser hergestellt. Anschließend wurde die Alginat-Lösung in einem 1:1-Volumenverhältnis entweder zur NITEGE- oder zur NVTEGE-Lösung gegeben und mit einer Eppendorfpipette durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren durchmischt. Die Charakterisierung der erhaltenen Nanopartikel erfolgte im Anschluss der Herstellung über Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS). Ausgewählte Proben wurden zudem per Kryo-REM analysiert (siehe Kapitel 8.3).

8.6.4 Stabilität der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen

1 mL der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen (4:1 für α PLL, jeweils 1 mg/mL in PBS oder 1:1 für NITEGE bzw. NVTEGE, jeweils 1 mg/mL in Reinstwasser) wurde in eine Einwegküvette gegeben. Das Degradationsverhalten wurde anschließend über Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) mithilfe eines Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN INSTRUMENTS bei 37 °C verfolgt.

8.6.5 Degradation der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen

990 μ L der Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen (4:1 für α PLL, jeweils 1 mg/mL in PBS oder 1:1 für NITEGE bzw. NVTEGE, jeweils 1 mg/mL in Reinstwasser) wurden in eine Einwegküvette gegeben und bei 37 °C inkubiert. In der Folge wurden 10 μ L von 250 μ g/mL-konzentrierten Enzymlösungen (Trypsin, Thermolysin oder Alginat-Lyase) zugefügt, um eine finale Enzymkonzentration von 2,5 μ g/mL zu erhalten. Das Degradationsverhalten wurde über Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) mithilfe eines Zetasizer Nano ZS der Firma MALVERN INSTRUMENTS bei 37 °C verfolgt.

8.6.6 Beschichtung von Titansubstraten mit Alginat/Peptid-Nanopartikeln

Die Beschichtung von Titansubstraten mit den Alginat/Peptid-Nanopartikelsuspensionen (4:1 für α PLL, jeweils 1 mg/mL in Reinstwasser oder 1:1 für NITEGE bzw. NVTEGE, jeweils 1 mg/mL in Reinstwasser) wurde über eine 3-minütige Sprühbeschichtung gemäß Kapitel 8.4.2 durchgeführt.

8.6.7 Stabilität der Alginat/Peptid-Beschichtungen

Die beschichteten Titansubstrate wurden in Triplikaten in je 1 mL Reinstwasser in einem 24-Well-Plate platziert und bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Zeitintervallen wurden die Plättchen aus der Lösung entnommen, im N₂-Strom getrocknet und am Ellipsometer vermessen (siehe Kapitel 8.4.4). Im Anschluss wurden die Substrate erneut in jeweils 1 mL frischem Reinstwasser bei 37 °C gelagert.

Für Degradationsstudien in Gegenwart von Trypsin, Thermolysin und Alginat-Lyase wurden die beschichteten Titanplättchen zu Triplikaten in jeweils 990 μ L Reinstwasser gelegt, bevor 10 μ L einer 250 μ g/mL-konzentrierten Enzymlösung für eine Endkonzentration von 2,5 μ g/mL zugefügt wurden. Nach definierten Zeitabschnitten wurden die Substrate aus der Lösung entnommen, mit N₂ getrocknet und am Ellipsometer charakterisiert. Danach wurden die Substrate erneut in jeweils 1 mL frischem Medium bei 37 °C gelagert.

8.6.8 Einkapselung von IFN β in Alginat/NVTEGE-Nanopartikel

Für die Nanopartikelformulierungen mit IFN β wurde zunächst das Volumen der Polysaccharidkomponente (1 mg/mL in 0,1 % Reinstwasser für Alginat) vorgelegt. Anschließend wurde das Protein IFN β (10700 U/mL für *nicht-kommerzielles IFN β* ; 5.000 U/mL für *kommerzielles IFN β*) hinzugegeben und mithilfe einer Eppendorfpipette vermischt. Danach wurde das entsprechende Volumen des jeweiligen Crosslinkers (1 mg/mL in 0,1 % Reinstwasser für NITEGE) hinzugefügt, um für Alginat/NITEGE ein Volumenverhältnis von 1:1 zu erhalten. Durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Suspensionen mit einer Eppendorfpipette wurde eine homogene Durchmischung der Proben erreicht.

8.6.9 Freisetzung von IFN β aus Alginat/Peptid-Nanopartikeln

Mx2Luc2-Zellen wurden in 24-Well-Platten mit 50.000 Zellen pro Well in DMEM-Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde das DMEM-Medium entfernt, bevor IFN β in Medium (für Konzentrationsreihe) bzw. die

Nanopartikel mit IFN β (Messung der Einkapselungseffizienz) hinzugegeben wurden. Die behandelten Zellen wurden erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde aus den Wells der Überstand entfernt, mit PBS gewaschen und mit 125 μ L Reporterlysepuffer (RLB) versetzt. Die 24-Well-Plates wurden bei -80°C für mindestens 30 Minuten aufbewahrt. Im Anschluss wurden in einem entsprechenden Röhrchen 20 μ L von jedem Well in 100 μ L einer Luciferase-Lösung hinein pipettiert und mithilfe eines Luminometers des Typs Lumat LB 9507 der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES (Bad Wildbad, Deutschland) vermessen.

8.6.10 Freisetzung von eGFP aus Alginat/Peptid-Nanopartikeln

Für die Nanopartikelformulierungen mit eGFP wurde zunächst das entsprechende Volumen der Polysaccharidkomponente (1 mg/mL in Reinstwasser für Alginat) vorgelegt. Anschließend wurden $1,47 \times 10^{-3}$ μ mol/mL eGFP (Ausgangskonzentration 0,049 μ mol/mL) hinzugegeben und mithilfe einer Eppendorfpipette vermischt. Danach wurde das entsprechende Volumen des jeweiligen Crosslinkers (1 mg/mL in Reinstwasser für α PLL, NITEGE und NVTEGE) hinzugefügt, um für Alg/ α PLL ein Volumenverhältnis von 4:1 und Alg/NITEGE und Alg/NVTEGE ein Volumenverhältnis von 1:1 zu erhalten. Durch wiederholtes Aufziehen und Entleeren der Suspensionen mit einer Eppendorfpipette wurde eine homogene Durchmischung der Proben erreicht. Optional wurde für die Alg/eGFP/Peptid-Formulierungen ein Zentrifugationsschritt eingeführt (15 min, 16.800 Umdrehungen pro Minute). Als Kontrollen wurden Alg/Peptid-Suspensionen und $1,47 \times 10^{-3}$ μ mol/mL freies eGFP in Reinstwasser verwendet. Für die Fluoreszenz-Untersuchungen wurden die Proben 1:2 in Wasser verdünnt und an einem Fluoreszenz-Plattenlesegerät des Typs TriStar² Multimode Reade LB 942 der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES (Bad Wildbad, Deutschland) vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der „ICE Software for Instrument Control and Evaluation“ der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Der Rückstand der zentrifugierten Proben wurde zunächst zweimal mit insgesamt 100 μ L Wasser gewaschen, bevor eine Resuspendierung mit 100 μ L Wasser erfolgte. Anschließend wurden die Suspensionen am Fluoreszenz-Plattenlesegerät vermessen.

8.6.11 Freisetzung von eGFP aus Alginat/Peptid-Beschichtungen

Die Herstellung der Alg/eGFP/Peptid-Nanopartikelformulierungen erfolgte analog zu Kapitel 8.6.10. Anschließend wurden für jede Formulierung jeweils drei Reintitanplättchen (medizinische Qualität 4) für 10 min mit einem Luftplasma (75 W) gereinigt und zunächst

durch Einlegen in einer PEI-Lösung (5 % w/w) mit einer Grundschrift versehen. Danach wurden die Substrate für 3 min (entspricht ungefähr 20 µL) mit den Nanopartikelsuspensionen beschichtet. Die Proben wurden durch Schwenken in Reinstwasser gewaschen und in einem 24-Well-Plate bei 37 °C in 1,5 mL Reinstwasser inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten (0,5, 2 und 24 h) wurden pro Well jeweils zwei Aliquote à 100 µL entnommen und am Fluoreszenz-Plattenlesegerät vermessen. Zusätzlich wurden zwei identische Konzentrationsreihen von eGFP ($2,94 \times 10^{-5}$ µmol/mL, $1,47 \times 10^{-5}$ µmol/mL, $7,35 \times 10^{-6}$ µmol/mL und $3,675 \times 10^{-6}$ µmol/mL) erstellt und zu den gegebenen Zeitpunkten jeweils zweifach vermessen.

8.7 Zellkompatibilitätstests

Humane Gingivafibroblasten (HGFib) werden in „DULBECCO's modified eagle medium“ (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin bei 37 °C in einer Atmosphäre aus befeuchteter Luft mit 5 % CO₂ kultiviert.

8.7.1 CellTiterBlue- und LDH-Assay der Nanopartikelsuspensionen

In einem 96-Well-Plate werden 3.000 HGFib-Zellen pro Well in 0,2 mL DMEM ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 24 Stunden mit den Nanopartikelsuspensionen stimuliert. Als Kontrolle wurde PBS in einer 5-stufigen Verdünnungsreihe in einem DMEM-Mangelmedium (DMEM mit 5 % FBS) untersucht. Die LDH-Analytik wurde im Überstand durchgeführt, während die Zellvitalität der adhärenen Zellen mittels CellTiterBlue nach 4-stündigem Umsatz bestimmt wurde.

8.7.2 LDH-Assay der Nanopartikelbeschichtungen

In einem 24-Well-Plate mit den zu untersuchenden Beschichtungen wird zu jeder Probe eine Lösung mit einer HGFib-Konzentration von 15.000 Zellen/mL gegeben. Anschließend werden die Proben für 24 bzw. 72 Stunden inkubiert. Die Entfernung nicht-adhärenen Zellen erfolgt durch das Waschen mit 1 mL „HANK's buffered salt solution“ (HBSS), bevor die Proben mit 1 mL frischem HBSS bedeckt werden. Die Zellen wurden mit 250 µL Triton X-100 (10%) lysiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die Quantifizierung wurden 100 µL Zelllösung und 100 µL „cytotoxicity detection kit“ hinzugegeben und das 24-Well-Plate in der Dunkelheit für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 50 µL 1 M HCl wird die Reaktion

beendet. Mit einem ELISA-Reader des Typs Infinite F200 der Firma TECAN (Männedorf, Schweiz) wurde die Messung bei 420 nm gegen 650 nm als Referenz durchgeführt.

Die Untersuchung der Zellmorphologien erfolgte mit den inkubierten Proben aus dem LDH-Assay, indem die Wells zunächst mit PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden anschließend mit 2,5 %-igem Glutaraldehyd in 0,1 M Dimethylarsinsäure für zwei Stunden fixiert. In der Folge wurden die Plättchen mit 0,1 M Dimethylarsinsäure gewaschen und durch Waschen in Ethanol dehydriert. Für die REM-Messungen wurden die Proben durch „critical point drying“ (CPD) getrocknet und mit Gold besputtert.

8.8 Thiol-En-Synthesen

8.8.1 UV-Vernetzung

Die Thiol-En-Kupplung erfolgte in einem mit Inertgas (Stickstoff) befüllten Schlenkkolben durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $360 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$ für 30 min. Als UV-Quelle wurde eine 350 W Quecksilberdampf Lampe des Typs 68810 der Firma ORIEL COMPANY (Stratford, USA) verwendet. Für die Bestrahlung wurde eine Belichtungsstärke von 100 mW/cm^2 gewählt. Um UV-Licht im gewünschten Wellenlängenbereich zu erhalten, wurde ein entsprechender optischer Filter des Typs UG 11 der Firma SCHOTT AG (Mainz, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde ein Wasserfilter benutzt, um infrarotes Licht auszublenden.

8.8.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Der Reaktionsumsatz wurde durch Dünnschichtchromatographie verfolgt und auf entsprechenden TLC Silicagel F₂₅₄-Platten von der Firma MERCK (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Das DITTMER-LESTER-Färbereagens für phosphonathaltige Verbindungen wurde nach dem Protokoll von DITTMER et al. hergestellt.²⁵⁸ Dafür wurden zunächst separat zwei Lösungen angesetzt, im Folgenden mit I und II bezeichnet werden. Für Lösung I wurden 0,28 mol Molybdän(VI)-oxid (MoO_3) in einem Liter 25 N Schwefelsäure für drei bis vier Stunden am Rückfluss erhitzt. Die erhaltene Lösung I wurde über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt, sodass eine blaue Färbung entstand. Für Lösung II wurden 0,018 mol Molybdänpulver für 15 Minuten in 500 mL von Lösung I unter Refluxbedingungen erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde Lösung II abdekantiert. Das eigentliche DITTMER-LESTER-Färbereagens wurde präpariert, indem gleiche Volumina der Lösungen I und II zu

4,5 Volumenteilen Wasser gegeben wurden. In der Folge entstand eine dunkelgrüne Lösung, die zum Anfärben der Verbindungen verwendet wurde.

8.8.3 Säulenchromatographie

Die Trennung der Verbindungen erfolgte präparativ per Säulenchromatographie auf einer Silicagel-Matrix des Typs 60 M der Firma MACHEREY NAGEL (Düren, Deutschland) mit Porengrößen von 0,04 – 0,063 mm.

8.8.4 NMR-Spektroskopie

Sämtliche ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{31}P -NMR-Spektren der Thiol-En-Produkte wurden auf einem AV III-400-Spektrometer der Firma BRUKER (Billerica, USA) mit einer magnetischen Feldstärke von 9,4 T und 400 MHz gemessen. Als deuterierte Lösungsmittel wurden D_2O mit der Referenz DSS und CDCl_3 mit der Referenz TMS verwendet.

8.8.5 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden im analytischen Labor der medizinischen und pharmazeutischen Chemie der TU Braunschweig an einem Gerät des Typs EA 1112 der Firma THERMO QUEST ITALIA S.P.A. (Rodano, Italien) durchgeführt.

8.8.6 FTIR-Spektroskopie

Für infrarotspektroskopische Untersuchungen an KBr-Presslingen stand ein Equinox 55 Spektrometer der Firma BRUKER (Billerica, USA) mit einem DTGS-Detektor (Deuteriertes Triglycinsulfat) zur Verfügung. Hintergrundmessungen wurden zunächst an reinem KBr im Bereich von $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, bei 10 KHz und 32 Scans pro Probe durchgeführt, bevor jede Verbindungen auf einem einzelnen KBr-Pressling ($4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, 10 KHz und 64 Scans) analysiert wurde. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der Software OPUS der Firma BRUKER.

8.8.7 Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS-Analysen wurden am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Papke an einem Massenspektrometer des Typs LTQ-Orbitrap Velos von der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, USA) durchgeführt. Die Spray-Spannung betrug in dem positiven Ionen-Modus zwischen 2,3 und 2,8 kV.

8.8.8 Synthesevorschriften

Allyldiethylphosphonat **1**²¹⁷

Unter Inertgasbedingungen wurden 30 mmol Triethylphosphit zu 45 mmol Allylbromid zugetropft. Die Lösung wurde anschließend für 20 h bei 150 °C am Rückfluss gekocht, bevor das Produkt bei reduziertem Druck (90 °C, 8 mbar) destilliert wurde. Allyldiethylphosphonat **1** wurde als farblose Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 76 % erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 5,75-5,87 (m, 1xCH); 5,17-5,26 (m, 1xCH₂); 4,05-4,1 (m, 2xCH₂); 2,57-2,66 (m, 1xCH₂); 1,32 (t, 6 H, J = 7,06, 2xCH₃). ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 127,45 (1xCH); 119,75 (1xCH₂); 61,85 (2xCH₂); 31,5 (1xCH₂); 16,35 (2xCH₃). IR (KBr) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2983 (m); 1640(w); 1395 (w); 1256 (s); 1028 (s); 962 (s).

Allgemeine Arbeitsvorschrift der Thiol-En-Reaktion

In dem Standardprotokoll (1:1-Verhältnis) wurden 3,5 mmol (1 eq.) des Allyldiethylphosphonats **1** unter Inertbedingungen zu 3,5 mmol (1 eq.) der Verbindung 1,6-Hexandithiol **2a** bzw. 2,2-Ethylendioxydiethanthiol **2b** in 12,5 mL Dimethylformamid (DMF) gegeben. Anschließend wurden 0,77 mmol (0,22 eq.) des Fotoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-Phenylacetophenon (DMPAP) hinzugefügt und der Reaktionskolben insgesamt dreimal evakuiert und mit Stickstoff gefüllt. Danach wurde die Reaktionsmischung für 30 Minuten bei 365 nm unter Verwendung der Quecksilberdampflampe bestrahlt. Die resultierende gelbliche Lösung wurde zunächst mit 100 mL Wasser verdünnt und dann dreimal mit jeweils 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden in der Folge mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, bevor sie über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer aufkonzentriert wurden. Die Verbindungen wurden dann mittels säulenchromatographischer Methoden auf einer Silicagel-Matrix aufgereinigt.

Diethyl(3-((6-mercaptohexyl)thio)propyl)phosphonat **5a**

R_f = 0,63 (95:5 EtOAc/MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 4,03-4,17 (m, 4H); 2,46-2,61 (m, 4H); 1,22-1,95 (m, 21H). ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 61,60 (2xCH₂); 33,88 (CH₂); 32,62 (CH₂); 31,81 (CH₂); 29,48 (CH₂); 28,15 (CH₂); 25,38 (CH₂); 24,58 (CH₂); 23,97 (CH₂); 22,61 (CH₂); 16,45 (2xCH₃). ³¹P-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 32,14 (P). ESI-MS m/z [%] = 329,14 [M + H]⁺

(100), 330,14 (14), 331,13 (8). IR (KBr) [cm^{-1}] = 3464 (m), 2930 (s), 2855 (s), 2530 (m), 1737 (m), 1648 (m), 1447 (m), 1393 (m), 1232 (s), 1027 (s), 961 (s).

Elementaranalyse [%]	(theoretisch)	= C: 47,54 %; H: 8,90 %; S: 19,52 %
	(experimentell)	= C: 46,13 %; H: 8,63 %; S: 18,51 %

Tetraethyl((hexan-1,6-diylbis(sulfanediy))bis(propan-3,1-diyl))bis(phosphonat) 3a

$R_f = 0,3$ (95:5 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,03-4,17 (m, 8H); 2,47-2,62 (dt, 8H); 1,3-1,9 (m, 16H); 1,26 (t, 12H). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 61,50 (4x CH_2); 32,64 (CH_2); 32,46 (CH_2); 31,75 (2x CH_2); 29,43 (2x CH_2); 28,43 (2x CH_2); 25,29 (CH_2); 23,89 (CH_2); 22,55 (CH_2); 22,50 (CH_2); 14,14-20,98 (4x CH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 32,15 (2xP). ESI-MS m/z [%] = 529,19 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (100), 530,19 (24), 531,19 (8). IR (KBr) [cm^{-1}] = 3466 (s), 2931 (s), 1729 (m), 1675 (s), 1446 (s), 1392 (m), 1234 (s), 1164 (m), 1020 (s).

Elementaranalyse [%]	(theoretisch)	= C: 47,41 %; H: 8,75 %; S: 12,66 %
	(experimentell)	= C: 42,41 %; H: 8,00 %; S: 11,75 %

Diethyl(3-((2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)thio)propyl)phosphonat 5b

$R_f = 0,5$ (95:5 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,15-4,04 (m, 4H); 3,68-3,60 (m, 8H); 2,78-2,62 (m, 6H); 1,96-1,81 (m, 4H), 1,35-1,30 (t, $J = 7,3$ Hz; 2x CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 72,87 (CH_2); 70,97 (CH_2); 70,24 (CH_2); 70,17 (CH_2); 61,5 (CH_2); 61,4 (CH_2); 33,07 (CH_2); 32,9 (CH_2); 31,2 (CH_2); 22,64 (CH_2); 16,46 (CH_2); 16,4 (2x CH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,96. ESI-MS m/z [%] = 383,11 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (100), 384,11 (15), 385,10 (10). IR (KBr) [cm^{-1}] = 3468 (s), 2978 (s), 2910 (m), 2851 (m), 2538 (m), 1729 (m), 1648 (m), 1447 (m), 1393 (m), 1232 (s), 1027 (s), 961 (s).

Elementaranalyse [%]	(theoretisch)	= C: 43,30 %; H: 8,10 %; S: 17,80 %
	(experimentell)	= C: 42,99 %; H: 7,95 %; S: 17,21 %

Tetraethyl-7,10-dioxa-4,13-dithiahexadecan-1,16-diylbis(phosphonat) 3b

$R_f = 0,16$ (95:5 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,04-4,14 (m, 4H); 3,60-3,68 (m, 8H); 2,62-2,78 (m, 6H); 1,81-1,96 (m, 4H), 1,30-1,35 (t, $J = 7,3$ Hz; $4\times\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 70,93 ($2\times\text{CH}_2$); 70,26 ($2\times\text{CH}_2$); 61,53 ($2\times\text{CH}_2$); 61,47 ($2\times\text{CH}_2$); 33,06 (CH_2); 32,88 (CH_2); 25,26 (CH_2); 23,85 (CH_2); 22,69 (CH_2); 22,64 (CH_2); 16,47 ($2\times\text{CH}_2$); 16,41 ($4\times\text{CH}_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,96. ESI-MS m/z [%] = 561,18 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (100), 562,19 (22), 563,18 (9). IR (KBr) [cm^{-1}] = 3468 (s), 2978 (s), 2910 (m), 2851 (m), 2538 (m), 1729 (m), 1648 (m), 1447 (m), 1393 (m), 1232 (s), 1027 (s), 961 (s).

Elementaranalyse [%]	(theoretisch)	= C: 44,60 %; H: 8,23 %; S: 11,91 %
	(experimentell)	= C: 44,59 %; H: 8,14 %; S: 12,12 %

Anpassung der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Thiol-En-Reaktion

Für die Synthese der Verbindungen **7**, **8**, **9** und **10** wurde die Standardvorschrift leicht abgewandelt, indem bei der Reaktion ein molares Verhältnis der Edukte von 0,8 : 1 (Allyldiethylphosphonat **1** : Pentaerythritoltetrakis(3-mercaptopropionat) **6**) eingesetzt wurde. Die Extraktionsschritte blieben unverändert, während bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen aufgrund ihrer Polarität das EtOAc/MeOH-Laufmittelgemisch von 95/5 auf 80/20 gewechselt werden musste.

2-(((3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoyl)oxy)methyl)-2-(((3-mercaptopropanoyl)oxy)methyl)propan-1,3-diyl bis(3-mercaptopropanoat) 7

$R_f = 0,54$ (95:5 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,18 (s, $4\times\text{CH}_2$); 4,02-4,16 (m, $2\times\text{CH}_2$); 2,59-2,85 (m, $9\times\text{CH}_2$), 1,76-1,95 (m, $2\times\text{CH}_2$), 1,30-1,37 (t, $J = 7,1$ Hz, $2\times\text{CH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 170,0 ($4\times\text{Cq}$); 62,2 ($4\times\text{CH}_2$); 61,6 ($2\times\text{CH}_2$), 42,1 (Cq); 38,1 (CH_2); 34,5 (CH_2); 32,5 (CH_2); 26,6 (CH_2); 25,2 (CH_2); 23,8 (CH_2), 22,5 (CH_2); 19,5 ($3\times\text{CH}_2$), 16,5 ($2\times\text{CH}_3$). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,8. IR (KBr) = [cm^{-1}] 3365 (m), 2983 (m), 2942 (m), 2568 (w), 1735 (s), 1395 (m), 1354 (m), 1235 (s), 1152 (s), 1028 (s), 965 (s), 785 (w).

Elementaranalyse [%]	(theoretisch)	= C: 43,2 %; H: 6,5 %; S: 19,2 %
	(experimentell)	= C: 42,5 %; H: 6,3 %; S: 18,6 %

2,2-Bis(((3-((3-(diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoyl)oxy)methyl)propan-1,3-diylbis(3-mercaptopropanoat) 8

$R_f = 0,19$ (95:5 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,18 (s, 4xCH₂); 4,02-4,16 (m, 4xCH₂); 2,59-2,85 (m, 10xCH₂), 1,76-1,95 (m, 4xCH₂), 1,30-1,37 (t, J = 7,1 Hz, 4xCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 170 (4xCq); 62,2 (4xCH₂); 61,6 (4xCH₂), 42,1 (Cq); 38,1 (CH₂); 34,5 (CH₂); 32,5 (CH₂); 26,6 (CH₂); 25,2 (CH₂); 23,8 (CH₂), 22,5 (CH₂); 19,5 (3xCH₂), 16,5 (4xCH₃). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,8. IR (KBr) [cm^{-1}] = 3365 (m), 2983 (m), 2942 (m), 2568 (w), 1735 (s), 1395 (m), 1354 (m), 1235 (s), 1152 (s), 1028 (s), 965 (s), 785 (w).

Elementaranalyse [%] (theoretisch) = C: 44,1 %; H: 6,9 %; S: 15,2 %

(experimentell) = C: 42,4 %; H: 6,6 %; S: 14,2 %

2-(((3-((3-(Diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoyl)oxy)methyl)-2-(((3-mercaptopropanoyl)oxy)methyl)propan-1,3-diyl bis(3-((3-(diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoat) 9

R_f = 0,1 (95:5 EtOAc/ MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,18 (s, 4xCH₂); 4,02-4,16 (m, 12H); 2,59-2,85 (m, 11xCH₂), 1,76-1,95 (m, 6xCH₂), 1,30-1,37 (t, J = 7,1 Hz; 6xCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 170 (4xCq); 62,2 (4xCH₂); 61,6 (6xCH₂), 42,1 (Cq); 38,1 (CH₂); 34,5 (CH₂); 32,5 (CH₂); 26,6 (CH₂); 25,2 (CH₂); 23,8 (CH₂), 22,5 (CH₂); 19,5 (3xCH₂), 16,5 (6xCH₃). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,8. IR (KBr) [cm^{-1}] = 3365 (m), 2983 (m), 2942 (m), 1735 (s), 1395 (m), 1354 (m), 1235 (s), 1152 (s), 1028 (s), 965 (s), 785 (w).

Elementaranalyse [%] (theoretisch) = C: 44,6 %; H: 7,2 %; S: 12,5 %

(experimentell) = C: 45,2 %; H: 7,01 %; S: 11,5 %

2,2-Bis(((3-((3-(diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoyl)oxy)methyl)propan-1,3-diyl bis(3-((3-(diethoxyphosphoryl)propyl)thio)propanoat) 10

R_f = 0,054 (80:20 EtOAc/MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4,18 (s, 4xCH₂); 4,02-4,16 (m, 8xCH₂); 2,59-2,85 (m, 12xCH₂), 1,76-1,95 (m, 8xCH₂), 1,30-1,37 (t, J = 7,1 Hz, 8xCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 170 (4 Cq); 62,2 (4xCH₂); 61,6 (8xCH₂), 42,1 (Cq); 38,1 (1xCH₂); 34,5 (CH₂); 32,5 (CH₂); 26,6 (CH₂); 25,2 (CH₂); 23,8 (CH₂), 22,5 (CH₂); 19,5 (3xCH₂), 16,5 (8xCH₃). $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 31,8. IR (KBr) [cm^{-1}] = 3365 (m), 2983 (m), 2942 (m), 1735 (s), 1395 (m), 1354 (m), 1235 (s), 1152 (s), 1028 (s), 965 (s), 785 (w).

Elementaranalyse [%] (theoretisch) = C: 45 %; H: 7,4 %; S: 10,7 %

(experimentell) = C: 43,1 %; H: 6,8 %; S: 12,1 %

Allgemeine Arbeitsvorschrift der Hydrolysereaktion

Die Hydrolyse der disubstituierten Phosphonatester **5a** und **5b** wurde nach einer Vorschrift von ZHOU et al durchgeführt.²¹⁹ Dafür wurden 0,12 mmol (1 eq.) von **5a** oder **5b** bei 0 °C in 5 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 2,48 mmol (20 eq.) Bromtrimethylsilan (TMSBr) und 2,48 mmol (20 eq.) 2,4,6-Collidin hinzugefügt. Nach zwei Stunden wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gebracht und über Nacht gerührt. Am Folgetag wurden zunächst 5 mL Toluol hinzugegeben, bevor die Mischung am Rotationsverdampfer eingengt wurde. Danach wurden 22 eq. einer 1 M NaOH hineingetropft und für weitere drei Stunden gerührt. Die weiße Reaktionsmischung wurde dann in Aceton überführt und bei 4 °C für 24 h gehalten. Im Anschluss wurde die Mischung mit Wasser extrahiert und die wässrige Phase je dreimal mit Dichlormethan und Diethylether gewaschen. Nach Konzentrierung der wässrigen Phase im Vakuum konnten die Feststoffe **4a** und **4b** isoliert werden.

Tetranatrium((hexan-1,6-diylbis(sulfandiyl))bis(propan-3,1-diyl))diphosphonsäure 4a

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 2,55-2,65 (m, 4xCH₂); 1,70-1,84 (m, 2xCH₂); 1,53-1,663 (m, 2xCH₂); 1,37-1,51 (m, 4xCH₂). ¹³C-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 36,02 (CH₂), 35,83 (CH₂), 33,97 (2xCH₂), 32,39 (CH₂), 31,53 (2xCH₂), 31,10 (CH₂), 30,47 (2xCH₂), 27,36 (CH₂), 26,21 (CH₂). IR (KBr) [cm⁻¹] = 3434 (wt), 2850 (w), 2510 (w), 1443 (s), 1077 (m), 992 (m), 880 (m).

Tetranatrium-7,10-dioxa-4,13-dithiahexadecan-1,16-diylidiphosphonsäure 4b

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 4,71-4,80 (m, 4xCH₂); 2,79-2,86 (m, 2xCH₂); 2,64-2,71 (m, 2xCH₂); 1,72-1,87 (m, 2xCH₂); 1,40-1,54 (m, 4xCH₂). ¹³C-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 72,36 (2xCH₂); 72,1 (2xCH₂); 36,12 (CH₂); 35,93 (CH₂); 33,21 (2xCH₂); 32,28 (CH₂); 30,99 (CH₂); 27,46 (CH₂); 27,43 (CH₂). IR (KBr) [cm⁻¹] = 3444 (wt), 2944 (m), 1631 (m), 1438 (s), 1062 (s), 992 (m), 880 (m).

8.9 ChitosanAzid-Synthese

Für die Herstellung der CSAzid-Derivate wurden 25 mg des niedrig deacetylierten Chitosans (CS-58) in 10 mL 0,005 M Salzsäure gelöst. Anschließend wurden unterschiedliche Mengen an Natrium-4-Azidobenzoat hinzugegeben (siehe Tabelle 8-4), bevor der pH-Wert der Lösung zwischen pH 6 und 7 eingestellt werden. Anschließend wurden 1,2 Äquivalente von 4-(4,6-

Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (DMT-MM) im Verhältnis zu Natrium-4-Azidobenzoat hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 48 h unter Lichtausschluss gerührt und daraufhin dreimal gegen 0,1 M NaCl und sechsmal gegen entionisiertem Wasser dialysiert. Die Produkte wurden durch die Entfernung von Wasser per Lyophilisierung isoliert.

Tabelle 8-4 Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen der DMT-MM-initiierten Amidkupplung von Natrium-4-Azidobenzoat mit Chitosan-58.

Ansatz	CS-58 / mmol	Na-4-Azidobenzoat / mmol	DMT-MM / mmol	Reaktionszeit / h	Ausbeute / %	DS / %
CSAzid10	0,162	0,016	0,019	24	97	0,75
CSAzid20	0,158	0,031	0,037	24	96	3
CSAzid30	0,132	0,039	0,047	24	98	6

8.10 sRGD-Alginat

Die Herstellung der sRGD-Alginat-Derivate erfolgte nach einer Vorschrift von ROWLEY et al., indem 100 mg Natriumalginat in 10 mL eines MES-Puffers (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) bei pH 6,5 gelöst wurden. Im Anschluss wurden definierte Mengen N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) in jeweils 0,2 mL Reinstwasser hinzugefügt und die Reaktionsmischung für fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine 1 mg/mL-konzentrierte GRGDSP-Peptidsequenz zugegeben und die erhaltene Lösung für eine bestimmte Zeit gerührt. Nach Dialyse (MWCO = 3.500 kDa) gegen 0,1 M NaCl-Lösung und Reinstwasser und anschließender Lyophilisierung konnten die sRGD-modifizierten Alginat erhalten werden.¹⁴⁶ Insgesamt wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 8-5 illustriert sind.

Tabelle 8-5 Zusammenfassung der Ergebnisse der EDC-initiierten Amidkupplung der GRGDS-Sequenz an Natriumalginat.

Ansatz	NHS / mmol	EDC / mmol	GRGDS (1 mg/mL) / mL	Reaktionszeit / h	Ausbeute / %	DS / %
sRGD-100	0,03	0,051	0,1	17	90	0,26
sRGD-250	0,073	0,125	0,25	21	90	0,73
sRGD-500	0,146	0,25	0,5	21	97	0,91

IR (ATR) [cm^{-1}] = 3251 (w), 1598 (s), 1408 (m), 1338 (w), 1027 (s).

Elementaranalyse [%]	sRGD-100	= C: 32,14 %; H: 4,55 %; N: 0,13 %
	sRGD-250	= C: 30,63 %; H: 4,69 %; N: 0,34 %
	sRGD-500	= C: 30,66 %; H: 4,44 %; N: 0,43 %
	cRGD-Alginat	= C: 31,21 %; H: 3,90 %; N: 0,60 %
GPC	sRGD-100	$M_n = 57 \pm 2 \text{ kDa}$
	sRGD-250	$M_n = 63 \pm 2 \text{ kDa}$
	sRGD-500	$M_n = 63 \pm 2 \text{ kDa}$

9. Literaturverzeichnis

- (1) Mano, J. F. *Biomimetic approaches for biomaterials development*, **2013**.
- (2) Poitout, D. G. *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*; Springer London, London, **2004**.
- (3) Gourlay, T.; Black, R. A. *Biomaterials and devices for the circulatory system*; Woodhead Pub., Cambridge, Philadelphia, **2010**.
- (4) Oga, M.; Sugioka, Y.; Hobgood, C. D.; Gristina, A. G.; Myrvik, Q. N. *Biomaterials* **1988**, 9, 285–289.
- (5) Harris, L. G.; Meredith, D. O.; Eschbach, L.; Richards, R. G. *J. Sci. Mater. Med.* **2007**, 18, 1151–1156.
- (6) Czaczyk, K.; Białas, W.; Myszk, K. *The Polish Society of Microbiologists* **2008**, 57, 313–319.
- (7) a) Petty, W.; Spanier, S.; Shuster, J. J.; Silverthorne, C. J. *Bone Joint Surg. Am.* **1985**, 67, 1236–1244.
 b) Patel, J. D.; Ebert, M.; Stokes, K.; Ward, R.; Anderson, J. M. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* **2003**, 14, 279–295.
 c) MacKintosh, E. E.; Patel, J. D.; Marchant, R. E.; Anderson, J. M. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, 78, 836–842.
- (8) Monroe, D. *Plos. Biol.* **2007**, 5, 2458–2461.
- (9) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. *Science* **1999**, 284, 1318–1322.
- (10) Marshall, K. C.; Stout, R.; Mitchell, R. J. *Gen. Microbiol.* **1971**, 68, 337–348.
- (11) Foster, T. J.; Geoghegan, J. A.; Ganesh, V. K.; Höök, M. *Nat. Rev. Micro.* **2013**, 12, 49–62.
- (12) Kalia, V. C.; Purohit, H. J. *Cri. Rev. Microbiol.* **2011**, 37, 121–140.
- (13) Vickery, K.; Hu, H.; Jacombs, A. S.; Bradshaw, D. A.; Deva, A. K. *Healthcare Infection* **2013**, 18, 61–66.
- (14) Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, 18, 1049–1056.
- (15) Eiff, C. von; Jansen, B.; Kohnen, W.; Becker, K. *Drugs* **2005**, 65, 179–214.
- (16) Zhao, L.; Chu, P. K.; Zhang, Y.; Wu, Z. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2009**, 91B, 470–480.
- (17) Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. *Chem. Soc. Rev* **2006**, 35, 780–789.
- (18) Stigter, M.; Bezemer, J.; Groot, K. de; Layrolle, P. J. *Control. Release* **2004**, 99, 127–137.
- (19) Balaban, N. *Control of biofilm infections by signal manipulation*, Springer, Berlin, **2008**.
- (20) Roe, D.; Karandikar, B.; Bonn-Savage, N.; Gibbins, B.; Rouillet, J.-B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, 61, 869–876.
- (21) Sonawane, A.; Jena, Mohanty; Mallick; Jacob. *IJN* **2012**, 1805–1818.
- (22) a) Xue, Y.; Xiao, H.; Zhang, Y. *IJMS* **2015**, 16, 3626–3655.
 b) Beyth, N.; Yudovin-Farber, I.; Bahir, R.; Domb, A. J.; Weiss, E. I. *Biomaterials* **2006**, 27, 3995–4002.
- (23) Pfaffenroth, C.; Winkel, A.; Dempwolf, W.; Gamble, L. J.; Castner, D. G.; Stiesch, M.; Menzel, H. *Macromol. Biosci.* **2011**, 11, 1515–1525.
- (24) Allen, T. M. *Science* **2004**, 303, 1818–1822.
- (25) De Villiers, Melgardt M; Aramwit, P.; Kwon, G. S. *Nanotechnology in drug delivery*, Springer, New York, **2009**.
- (26) Pathak, Y.; Thassu, D. *Drug delivery nanoparticles formulation and characterization*, Informa Healthcare, New York, **2009**.

- (27) Kazunori, K.; Glenn S., K.; Masayuki, Y.; Teruo, O.; Yasuhisa, S. *J. Control. Release* **1993**, 24, 119–132.
- (28) Kompella, U. B.; Edelhauser, H. F. *Drug Product Development for the Back of the Eye*, Springer, Boston, **2011**.
- (29) Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Smart materials for drug delivery*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2013**.
- (30) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 47, 113–131.
- (31) Chen, X. *Nanoplatfrom-based molecular imaging*, Wiley, Hoboken, **2011**.
- (32) Gregoriadis, G. *Liposome technology*, Informa Healthcare, New York, **2007**.
- (33) Senior, J. H. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1987**, 3, 123–193.
- (34) Thassu, D.; Deleers, M.; Pathak, Y. *Nanoparticulate drug delivery systems*, Informa Healthcare, New York, **2007**.
- (35) Maruyama, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, 161–169.
- (36) Hoare, T. R.; Kohane, D. S. *Polymer* **2008**, 49, 1993–2007.
- (37) Hoffman, A. S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 18–23.
- (38) Hudson, D.; Margaritis, A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2014**, 34, 161–179.
- (39) Steichen, S. D.; Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 48, 416–427.
- (40) Prasad, P. N. *Introduction to nanomedicine and nanobioengineering*, Wiley, Hoboken, **2012**.
- (41) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. *Pharmacol. Rep.* **2012**, 64, 1020–1037.
- (42) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 19–34.
- (43) Rodrigues, S.; Costa, Ana M. Rosa da; Grenha, A. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 89, 282–289.
- (44) Kührtreiber, W. M.; Lanza, R. P.; Chick, W. L. *Cell encapsulation technology and therapeutics*, Birkhäuser, Basel, **1999**.
- (45) Mishra, M. K. *Handbook of encapsulation and controlled release*, CRC Press, **2015**.
- (46) Thomas, S.; Grohens, Y.; Ninan, N. *Nanotechnology applications for tissue engineering*, Elsevier, **2015**.
- (47) Majoros, I. J.; Myc, A.; Thomas, T.; Mehta, C. B.; Baker, J. R. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 572–579.
- (48) Yeo, Y. *Nanoparticulate drug delivery systems: Strategies, technologies, and applications*, Wiley, Hoboken **2013**.
- (49) Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. *Dendrimers in medicine and biotechnology: New molecular tools*, RSC Pub., Cambridge, **2006**.
- (50) a) Li, Q. *Intelligent stimuli-responsive materials: From well-defined nanostructures to applications*, Wiley, Hoboken, **2013**.
b) Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. *J. Control. Release* **2008**, 126, 187–204.
- (51) Gao, W.; Chan, J. M.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, 7, 1913–1920.
- (52) a) Yassin, M. A.; Appelhans, D.; Mendes, R. G.; Rummeli, M. H.; Voit, B. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 12227–12231.
b) Gao, Z. G.; Lee, D. H.; Kim, D. I.; Bae, Y. H. *J. Drug Target.* **2015**, 13, 391–397.
- (53) Jochum, F. D.; Theato, P. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 7468–7483.
- (54) Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55, 199–215.

- (55) Montero, D.; Tachibana, C.; Rahr Winther, J.; Appenzeller-Herzog, C. *Redox Biology* **2013**, 1, 508–513.
- (56) Radhakrishnan, K.; Tripathy, J.; Raichur, A. M. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5390–5392.
- (57) de la Rica, Roberto; Aili, D.; Stevens, M. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 967–978.
- (58) Baier, G.; Cavallaro, A.; Vasilev, K.; Mailänder, V.; Musyanovych, A.; Landfester, K. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1103–1112.
- (59) Yuan, Q.; Venkatasubramanian, R.; Hein, S.; Misra, R. *Acta Biomater.* **2008**, 4, 1024–1037.
- (60) Chang, M.-W.; Edirisinghe, M.; Stride, E. J. *Mater. Chem. B.* **2013**, 1, 3962–3971.
- (61) Florence, A. T.; Attwood, D. *Physicochemical principles of pharmacy*, Pharmaceutical Press, London, **2011**.
- (62) Lopes, J.; Santos, G.; Barata, P.; Oliveira, R.; Lopes, C. *CPD* **2013**, 19, 7169–7184.
- (63) Dissemond, J.; Witthoff, M.; Brauns, T. C.; Haberer, D.; Goos, M. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **2003**, 54, 959–965.
- (64) Pabst, G.; Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. *Liposomes, lipid bilayers and model membranes: From basic research to application*, CRC Press, **2014**.
- (65) Bradshaw, R. A.; Stahl, P. D. *Encyclopedia of cell biology*, Academic Press, **2015**
- (66) Philip, A.; Philip, B. *OMJ* **2010**, 25, 70–78.
- (67) Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, 49, 4373–4384.
- (68) Wike-Hooley, J. L.; Haveman, J.; Reinhold, H. S. *Radiother. Oncol.*, **1984**, 2, 343–366.
- (69) DeVita, V. T.; Lawrence, T. S.; Rosenberg, S. A. *Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer: Principles & practice of oncology*, Lippincott Raven, **2011**.
- (70) Griset, A. P.; Walpole, J.; Liu, R.; Gaffey, A.; Colson, Y. L.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2469–2471.
- (71) Na, K.; Lee, K. H.; Bae, Y. H. *J. Control. Release* **2004**, 97, 513–525.
- (72) Barton-Burke, M.; Wilkes, G. M. *Cancer therapies*; Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, **2006**.
- (73) Lee, E. J. *Control. Release* **2003**, 91, 103–113.
- (74) Yamashiro, D. J.; Maxfield, F. R. *J. Cell Biochem.* **1984**, 26, 231–246.
- (75) Gjerde, D. T.; Hoang, L.; Hornby, D. *RNA purification and analysis: Sample preparation, extraction, chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- (76) Hu, J.; Liu, G.; Wang, C.; Liu, T.; Zhang, G.; Liu, S. *Biomacromolecules* **2014**, 15, 4293–4301.
- (77) a) Sun, T.-M.; Du, J.-Z.; Yan, L.-F.; Mao, H.-Q.; Wang, J. *Biomaterials* **2008**, 29, 4348–4355.
b) Tietze, N.; Pelisek, J.; Philipp, A.; Roedl, W.; Merdan, T.; Tarcha, P.; Ogris, M.; Wagner, E. *Oligonucleotides* **2008**, 18, 161–174.
- (78) Shenoy, D.; Little, S.; Langer, R.; Amiji, M. *Pharm. Res.* **2005**, 22, 2107–2114.
- (79) a) Puoci, F. *Advanced polymers in medicine*, Springer, **2014**.
b) Bawa, P.; Pillay, V.; Choonara, Y. E.; Du Toit, L. C. *Biomed. Mater.* **2009**, 4, 22001.
- (80) a) Meyer, D. E.; Shin, B. C.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A. *J. Control. Release* **2001**, 74, 213–224.
b) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Nat. Mater.* **2013**, 12, 991–1003.
- (81) Li, J.; Wang, B.; Liu, P. *Med. Hypotheses* **2008**, 71, 249–251.
- (82) Kost, J.; Langer, R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 125–148.
- (83) Gandhi, A.; Paul, A.; Sen, S. O.; Sen, K. K. *Asian J. Pharm. Sci.*, **2015**, 10, 99–107.
- (84) Russo, A.; DeGraff, W.; Friedman, N.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1986**, 46, 2845–2848.

- (85) Templeton, N. S. *Gene and cell therapy: Therapeutic mechanisms and strategies*, CRC Press, **2003**.
- (86) Cavallaro, G.; Campisi, M.; Licciardi, M.; Ogris, M.; Giammona, G. *J. Control. Release* **2006**, 115, 322–334.
- (87) Buddecke, E. *Molekulare Medizin: Eine systematische Einführung*; ecomed, Landsberg/Lech, **2002**.
- (88) Carlisle, R. C.; Etrych, T.; Briggs, S. S.; Preece, J. A.; Ulbrich, K.; Seymour, L. W. *J. Gene Med.* **2004**, 6, 337–344.
- (89) Schmitz, T.; Bravo-Osuna, I.; Vauthier, C.; Ponchel, G.; Loretz, B.; Bernkop-Schnürch, A. *Biomaterials* **2007**, 28, 524–531.
- (90) West, K.; Otto, S. *CDDT* **2005**, 2, 123–160.
- (91) Huang, Z.; Li, W.; MACKAY, J.; Szokajr, F. *Molecular Therapy* **2005**, 11, 409–417.
- (92) Berger, A.; Bruck, J. C.; Bruck-Müller-Steen. *Handbuch der Verbrennungstherapie*; ecomed, Landsberg, **2002**.
- (93) Poth, N.; Seiffart, V.; Gross, G.; Menzel, H.; Dempwolf, W. *Biomolecules* **2015**, 5, 3–19.
- (93) Murphy, G.; Nagase, H. *Mol. Asp. Med.* **2008**, 29, 290–308.
- (94) Seliktar, D.; Zisch, A. H.; Lutolf, M. P.; Wrana, J. L.; Hubbell, J. A. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2004**, 68, 704–716.
- (95) Colombo, M.; Bianchi, A. *Molecules* **2010**, 15, 178–197.
- (96) Ferris, D. *Biomaterials* **1999**, 20, 2323–2331.
- (97) Fonseca, K. B.; Bidarra, S. J.; Oliveira, M. J.; Granja, P. L.; Barrias, C. C. *Acta Biomater.* **2011**, 7, 1674–1682.
- (98) Fuchs, A. V.; Kotman, N.; Andrieu, J.; Mailänder, V.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Nanoscale* **2013**, 5, 4829–4839.
- (99) Wen, J.; Anderson, S. M.; Du, J.; Yan, M.; Wang, J.; Shen, M.; Lu, Y.; Segura, T. *Adv. Mater.* **2011**, 23, 4549–4553.
- (100) Wanakule, P.; Liu, G. W.; Fleury, A. T.; Roy, K. *J. Control. Release* **2012**, 162, 429–437.
- (101) Gao, Z.-G.; Fain, H. D.; Rapoport, N. *J. Control. Release* **2005**, 102, 203–222.
- (102) Lee, H.-I.; Wu, W.; Oh, J. K.; Mueller, L.; Sherwood, G.; Peteanu, L.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2453–2457.
- (103) Kurniasih, I. N.; Keilitz, J.; Haag, R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4145–4164.
- (104) Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H.-A.; Zhong, Z. *Biomaterials* **2013**, 34, 3647–3657.
- (105) Soppimath, K. S.; Tan, D. C.-W.; Yang, Y. Y. *Adv. Mater.* **2005**, 17, 318–323.
- (106) Soppimath, K. S.; Liu, L.-H.; Seow, W. Y.; Liu, S.-Q.; Powell, R.; Chan, P.; Yang, Y. Y. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 355–362.
- (107) Zhang, J.; Wu, L.; Meng, F.; Wang, Z.; Deng, C.; Liu, H.; Zhong, Z. *Langmuir* **2012**, 28, 2056–2065.
- (108) Shu, S.; Zhang, X.; Wu, Z.; Wang, Z.; Li, C. *Biomaterials* **2010**, 31, 6039–6049.
- (109) Kim, S. W.; Oh, K. T.; Youn, Y. S.; Lee, E. S. *Colloids Surf., B* **2014**, 116, 359–364.
- (110) a) Kurisawa, M.; Matsuo, Y.; Yui, N. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, 705–709.
b) Kurisawa, M.; Yui, N. *J. Control. Release* **1998**, 54, 191–200.
- (111) *Römpp-Chemie-Lexikon*, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart, **1992**.
- (112) Garripelli, V. K.; Kim, J.-K.; Son, S.; Kim, W. J.; Repka, M. A.; Jo, S. *Acta Biomater.* **2011**, 7, 1984–1992.
- (113) Tücking, K.-S.; Grützner, V.; Unger, R. E.; Schönherr, H. *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, 36, 1248–1254.

- (114) Poth, N. F. Applikation von Nanopartikeln als Implantatbeschichtung zur Präsentation von biologisch aktivem BMP-2 an der Implantatoberfläche. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig, **2015**.
- (115) Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S.; Vårum, K.; Draget, K.; Nordgård, C. *Polymers* **2015**, 7, 552–579.
- (117) Gan, Q.; Wang, T.; Cochrane, C.; McCarron, P. *Colloids Surf., B* **2005**, 44, 65–73.
- (118) Gan, Q.; Wang, T. *Colloids Surf., B* **2007**, 59, 24–34.
- (119) Khatri, K.; Goyal, A. K.; Gupta, P. N.; Mishra, N.; Vyas, S. P. *Int. J. Pharm.* **2008**, 354, 235–241.
- (120) Katas, H.; Alpar, H. O. *J. Control. Release* **2006**, 115, 216–225.
- (121) Schiffer, D.; Verient, V.; Luschig, D.; Blokhuis-Arkes, Miriam H. E.; Palen, J. V. D.; Gamerith, C.; Burnet, M.; Sigl, E.; Heinzle, A.; Guebitz, G. M. *Eng. Life Sci.* **2015**, 15, 368–375.
- (122) Honarkar, H.; Barikani, M. *Monatsh. Chem.* **2009**, 140, 1403–1420.
- (123) Steinegger, E. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, Springer, Heidelberg, **2007**.
- (126) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, 36, 981–1014.
- (124) Alves, N. M.; Mano, J. F. *Int. J. Biol. Macromolec.* **2008**, 43, 401–414.
- (125) a) Nishi, N.; Ebina, A.; Nishimura, S.-i.; Tsutsumi, A.; Hasegawa, O.; Tokura, S. *Int. J. Biol. Macromolec.* **1986**, 8, 311–317.
b) Lillo, L. E.; Matsuhira, B. *Carbohydr. Polym.* **1997**, 34, 397–40.
- (126) Ravi Kumar, Majeti N.V. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1–27.
- (127) a) Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Muzzarelli, R. A. A. *Chitosan for Biomaterials II*; Springer, Berlin/Heidelberg, **2011**.
b) Kumar, M. N. V. Ravi; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 6017–6084.
- (128) Kean, T.; Thanou, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62, 3–11.
- (129) Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34, 641–678.
- (130) Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2005**, 26, 5872–5878.
- (131) Kulaev, I. S.; Vagabov, V. M.; Kulakovskaja, T. V. *The biochemistry of inorganic polyphosphates*, Wiley, Hoboken, **2004**.
- (132) Achbergerová, L.; Nahálka, J. *Microb. Cell. Fact.* **2011**, 10, 63.
- (133) Keefe, A. D.; Miller, S. L. *J. Mol. Evol.* **1995**, 41, 693–702.
- (134) Kornberg, A.; Rao, N. N.; Ault-Riché, D. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 89–125.
- (135) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **1997**.
- (136) Deshpande, S. S. *Handbook of food toxicology*, Marcel Dekker, New York, **2002**.
- (138) Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2002**, 28, 621–630.
- (139) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, 106–126.
- (140) Zorzin, L.; Cocchietto, M.; Voinovich, D.; Marcuzzi, A.; Fnipovic-Grcic, J.; Mulloni, C.; Crembiale, G.; Casarsa, C.; Bulla, R.; Sava, G. J. *Drug Deliv. Sci. Technol.* **2006**, 16, 413–420.
- (141) Anal, A. K.; Bhopatkar, D.; Tokura, S.; Tamura, H.; Stevens, W. F. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2003**, 29, 713–724.
- (142) Harnsilawat, T.; Pongsawatmanit, R.; McClements, D. J. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2052–2058.
- (143) Strand, B. L.; Gåserød, O.; Kulseng, B.; Espevik, T.; Skjåk-Bræk, G. J. *Microencapsul.* **2002**, 19, 615–630.

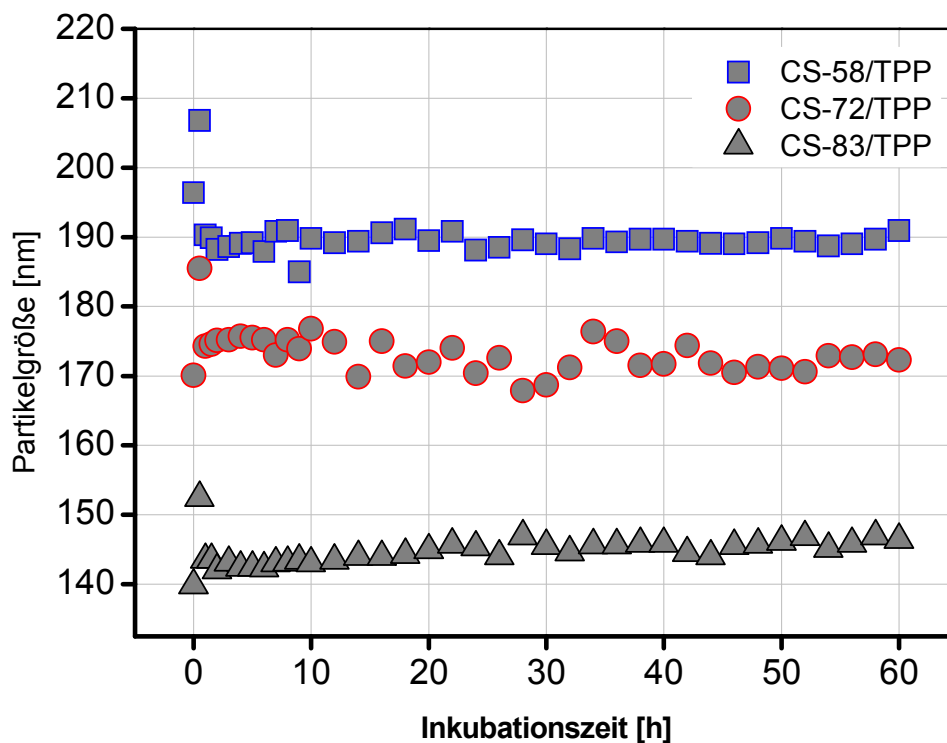
- (144) Orive, G.; Tam, S.; Pedraz, J. L.; Halle, J. *Biomaterials* **2006**, 27, 3691–3700.
- (145) Darrabie, M. D.; Kendall, W. F.; Opara, E. C. *Biomaterials* **2005**, 26, 6846–6852.
- (146) Rowley, J. A.; Madlambayan, G.; Mooney, D. J. *Biomaterials* **1999**, 20, 45–53.
- (147) Bhattarai, R.; Shrestha, A.; Dhandapani, N. *Chron. Young Sci.* **2011**, 2, 192–196.
- (148) Yang, J.-S.; Xie, Y.-J.; He, W. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 84, 33–39.
- (149) Leonard, M.; Boisseson, M. de; Hubert, P.; Dalençon, F.; Dellacherie, E. *J. Control. Release* **2004**, 98, 395–405.
- (150) Otterlei, M.; Ostgaard, K.; Skjåk-Braek, G.; Smidsrød, O.; Soon-Shiong, P.; Espevik, T. *J. Immunother.* **1991**, 10, 286–291.
- (151) Zimmermann, U.; Klöck, G.; Federlin, K.; Hannig, K.; Kowalski, M.; Bretzel, R. G.; Horcher, A.; Entenmann, H.; Sieber, U.; Zekorn, T. *Electrophoresis* **1992**, 13, 269–274.
- (152) Ménard, M.; Dusseault, J.; Langlois, G.; Baille, W. E.; K. Tam, S.; Yahia, L.; Zhu, X. X.; Hallé, J.-P. *J. Biomed. Mater. Res.* **2010**, 93B, 333–340.
- (153) a) Orive, G.; Ponce, S.; Hernández, R.; Gascón, A.; Igartua, M.; Pedraz, J. L. *Biomaterials* **2002**, 23, 3825–3831.
b) Lee, J.; Lee, K. Y. *Pharm. Res.* **2009**, 26, 1739–1744.
- (154) Al-Shamkhani, A.; Duncan, R. J. *Bioact. Compat. Polym.* **1995**, 10, 4–13.
- (155) Wong, T. Y.; Preston, L. A.; Schiller, N. L. *Annu. Rev. Microbiol.* **2000**, 54, 289–340.
- (156) Deming, T. J. *J. Polym. Sci. A Polym.* **2000**, 38, 3011–3018.
- (157) a) Vos, P. de; van Hoogmoed, Chris G; de Haan, Bart J; Busscher, H. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 62, 430–437.
b) Ma, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Chen, L.; Li, S.; Zhao, W.; Sun, G.; Li, N.; Wang, Y.; Guo, X.; Lv, G.; Ma, X. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2012**, 101, 1265–1273,
- (158) a) Darquy, S.; Pueyo, M. E.; Capron, F.; Reach, G. *Artif. Organs* **1994**, 18, 898–903.
b) Juste, S.; Lessard, M.; Henley, N.; Ménard, M.; Hallé, J.-P. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2005**, 72, 389–398.
- (159) Waley, S. G.; Watson, J. *Biochem. J.* **1953**, 55, 328–337.
- (160) Quong, D.; Yeo, J. N.; Neufeld, R. J. *J. Microencapsul.* **1999**, 16, 73–82.
- (161) Olsen, J. V. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3, 608–614.
- (162) Shukla, A. N. *Elements of enzymology*, Discovery Pub. House Pvt. Ltd., New Delhi, **2009**.
- (163) Arner, E. C. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, 2, 322–329.
- (164) Caterson, B.; Flannery, C. R.; Hughes, C. E.; Little, C. B. *Matrix Biol.* **2000**, 19, 333–344.
- (165) Huang, K.; Wu, L. D. *J. Int. Med. Res.* **2008**, 36, 1149–1160.
- (166) Lohmander, L. S.; Neame, P. J.; Sandy, J. D. *Arthritis Rheumatol.* **1993**, 36, 1214–1222.
- (167) Stanton, H.; Rogerson, F. M.; East, C. J.; Golub, S. B.; Lawlor, K. E.; Meeker, C. T.; Little, C. B.; Last, K.; Farmer, P. J.; Campbell, I. K.; Fourie, A. M.; Fosang, A. J. *Nature* **2005**, 434, 648–652.
- (168) Trinchieri, G. *J. Exp. Med.* **2010**, 207, 2053–2063.
- (169) Isaacs, A.; Lindenmann, J. *Proc. R. Soc. A* **1957**, 147, 258–267.
- (170) Decker, T.; Müller, M.; Stockinger, S. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 675–687.
- (171) Pulverer, J. E.; Rand, U.; Lienenklaus, S.; Kugel, D.; Zietara, N.; Kochs, G.; Naumann, R.; Weiss, S.; Staeheli, P.; Hauser, H.; Köster, M. *J. Virol* **2010**, 84, 8626–8638.
- (172) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223–239.
- (173) a) Yang, F.; Moss, L. G.; Phillips, G. N. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1246–1251.
b) Phillips, G. N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 821–827;
- (174) Phillips, G. J. *FEMS Microbio. Lett.* **2001**, 204, 9–18.
- (175) von Arnim, A G; Deng, X. W.; Stacey, M. G. *Gene* **1998**, 221, 35–43.

- (176) Elowitz, M. B.; Surette, M. G.; Wolf, P. E.; Stock, J. B.; Leibler, S. *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 197–203.
- (177) Walker, D.; Htun, H.; Hager, G. L. *Methods* **1999**, 19, 386–393.
- (178) Arpino, James A. J.; Rizkallah, P. J.; Jones, D. D.; Budisa, N. *PLoS ONE* **2012**, 7, e47132.
- (179) Nitzsche, R. *Malvern Instruments, Intensivkurs*, **2011**.
- (180) Tadros, T. F. *Colloids in agrochemicals*; Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- (181) a) Möbius, D.; Miller, R. *Novel methods to study interfacial layers*, Elsevier, Amsterdam/New York, **2001**.
b) Tompkins, H. G. *A user's guide to ellipsometry*; Academic Press, Boston, **1993**.
- (182) Drude, P. *Ann. Phys.* **1889**, 272, 532–560.
- (183) Stamm, M. *Polymer surfaces and interfaces: Characterization, modification and applications*, Springer, Berlin, **2008**.
- (184) Ferraro, J. R.; Basile, L. J. *Fourier Transform Infrared Spectra: Applications to Chemical Systems*, Elsevier, Oxford, **1985**.
- (185) Greenler, R. G. *J. Chem. Phys.* **1966**, 44, 310–315.
- (186) Vickerman, J. C.; Gilmore, I. S. *Surface analysis: The principal techniques*; John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2009**.
- (187) Einstein, A. *Ann. Phys.* **1905**, 322, 132–148.
- (188) Johannsmann, D. *The quartz crystal microbalance in soft matter research: Fundamentals and modeling*.
- (189) J. Curie, P. Curie. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1880**, 91, 294–295.
- (190) Sauerbrey, G. *Z. Physik (Zeitschrift für Physik)* **1959**, 155, 206–222.
- (191) Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5796–5804.
- (192) Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Phys. Scr.* **1999**, 59, 391–396.
- (193) Dixon, M. C. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **2008**, 19, 151–158.
- (194) Wink, M. *Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- (195) Xu, Y.; Du, Y. *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 215–226.
- (196) Brouwer, J.; van Leeuwen-Herbets, T.; Otting-van de Ruit, M. *Clin. Chim. Acta* **1984**, 142, 21–30.
- (197) Pangburn, S. H.; Trescony, P. V.; Heller, J. *Biomaterials* **1982**, 3, 105–108.
- (198) Ausserré, D.; Valignat, M.-P. *Nano Lett.* **2006**, 6, 1384–1388.
- (199) Ausserré, D.; Valignat, M.-P. *Opt. Express* **2007**, 15, 8329–8339.
- (200) Kamada, K.; Tokutomi, M.; Enomoto, N.; Hojo, J. *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 3388.
- (201) Cooper, M. A.; Steinem, C.; Janshoff, A. *Piezoelectric sensors*, Springer, Berlin/New York, **2007**.
- (202) Erickson, H. P. *Biol. Proced. Online* **2009**, 11, 32–51.
- (203) Boyd, R. D.; Pichaimuthu, S. K.; Cuenat, A. *Colloids Surf., A* **2011**, 387, 35–42.
- (204) Reddi, A. H. *Arthritis Res.* **2001**, 3, 1–5.
- (205) Teipel, U.; Gruber-Traub, C.; Burger-Kentischer, A.; Gretzinger, S.; Hirth, T.; Weber, A. *CIT* **2012**, 84, 343–348.
- (206) Basu, A.; Yang, K.; Wang, M.; Liu, S.; Chintala, R.; Palm, T.; Zhao, H.; Peng, P.; Wu, D.; Zhang, Z.; Hua, J.; Hsieh, M.-C.; Zhou, J.; Petti, G.; Li, X.; Janjua, A.; Mendez, M.; Liu, J.; Longley, C.; Zhang, Z.; Mehlig, M.; Borowski, V.; Viswanathan, M.; Filpula, D. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 618–630.
- (207) Bertz, A.; Ehlers, J.-E.; Wöhl-Bruhn, S.; Bunjes, H.; Gericke, K.-H.; Menzel, H. *Macromol. Biosci.* **2013**, 13, 215–226.

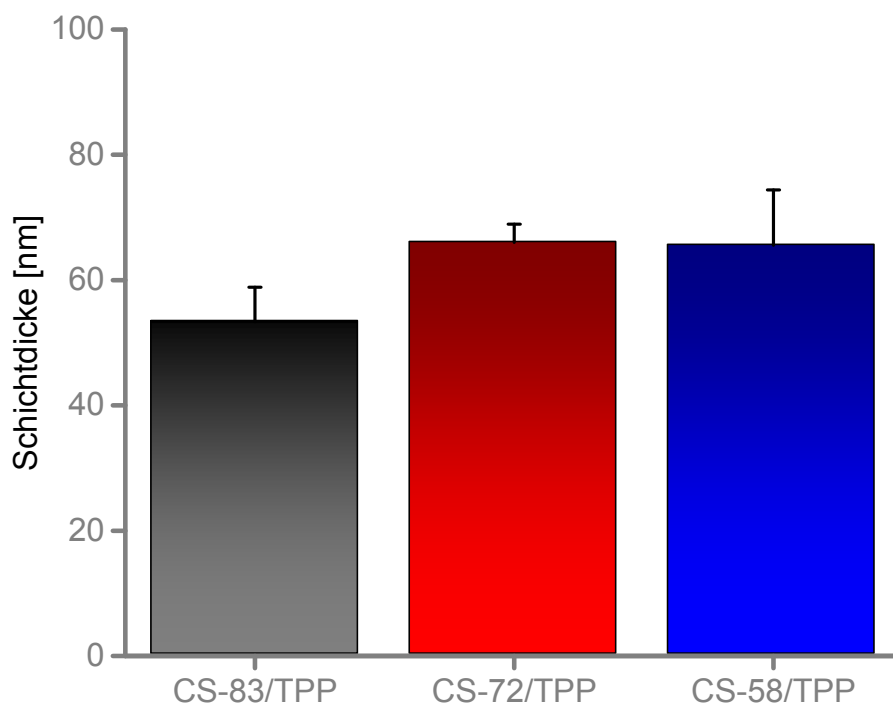
- (208) Servat-Medina, L.; González-Gómez, A.; Reyes-Ortega, F.; Sousa, Ilza Maria Oliveira; Queiroz, Nubia de Cássia Almeida; Zago, Patricia Maria Wiziack; Jorge, M. P.; Monteiro, K. M.; Carvalho, J. E.; San Román, J.; Foglio, M. A. *IJN* **2015**, 3897–3909.
- (209) Huang, M.; Khor, E.; Lim, L.-Y. *Pharm. Res.* **2004**, 21, 344–353.
- (210) a) Tamada, Y.; Kulik, E. A.; Ikada, Y. *Biomaterials* **1995**, 16, 259–261.
b) Heuer, W.; Winkel, A.; Kohorst, P.; Lutzke, A.; Pfaffenroth, C.; Menzel, H.; Bach, F.-W.; Volk, J.; Leyhausen, G.; Stiesch, M. *Adv. Eng. Mater.* **2010**, 12, B609–B617.
- (211) Amaral, I. F.; Cordeiro, A. L.; Sampaio, P.; Barbosa, M. A. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* **2007**, 18, 469–485.
- (212) Smetana, K. *Biomaterials* **1993**, 14, 1046–1050.
- (213) a) Claudino, M.; Jonsson, M.; Johansson, M. *RSC Adv.* **2013**, 3, 11021–11034.
b) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2014**, 5, 4820–4870.
- (214) a) Griesbaum, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, 9, 273–287.
b) Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T. J. *Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2004**, 42, 5301–5338.
- (215) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, 1, 17–36.
- (216) Mucci, V.; Vallo, C. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, 123, 418–425.
- (217) Das, S.; Kar, M.; Gupta, S. S. *Polym. Chem.* **2013**, 4, 4087–4091.
- (218) a) Ryu, E. K.; MacCoss, M. *J. Lipid Res.* **1979**, 20, 561–563.
b) Dyńska-Kukulska, K.; Ciesielski, W.; Zakrzewski, R. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, 27, 458–465.
- (219) Zhou, X.; Ferree, S. D.; Wills, V. S.; Born, E. J.; Tong, H.; Wiemer, D. F.; Holstein, S. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 2791–2798.
- (220) Quin, L. D.; Quin, G. S. *A guide to organophosphorus chemistry*; Wiley, New York, **2000**.
- (221) Hadler, C.; Wissel, K.; Brandes, G.; Dempwolf, W.; Reuter, G.; Lenarz, T.; Menzel, H. *Materials Science and Engineering: C* **2017**, 75, 286–296.
- (222) Rickett, T. A.; Amoozgar, Z.; Tucheck, C. A.; Park, J.; Yeo, Y.; Shi, R. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 57–65.
- (223) Ono, K.; Saito, Y.; Yura, H.; Ishikawa, K.; Kurita, A.; Akaike, T.; Ishihara, M. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 49, 289–295.
- (224) Sugawara, T.; Matsuda, T. *Langmuir* **1995**, 11, 2272–2276.
- (225) Murata, H.; Chang, B.-J.; Prucker, O.; Dahm, M.; Rühle, J. *Surf. Sci.* **2004**, 570, 111–118.
- (226) Mizutani, M.; Arnold, S. C.; Matsuda, T. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 668–675.
- (227) Tam, S. K.; Dusseault, J.; Bilodeau, S.; Langlois, G.; Hallé, J.-P.; Yahia, L. *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, 98A, 40–52.
- (228) Schneider, S.; Feilen, P. J.; Kraus, O.; Haase, T.; Sagban, T. A.; Lehr, H.-A.; Beyer, J.; Pommersheim, R.; Weber, M. M. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **2003**, 31, 383–394.
- (229) Jork, A.; Thürmer, F.; Cramer, H.; Zimmermann, G.; Gessner, P.; Hämel, K.; Hofmann, G.; Kuttler, B.; Hahn, H. J.; Josimovic-Alasevic, O.; Fritsch, K. G.; Zimmermann, U. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 53, 224–229.
- (230) Vos, P. de; Haan, B. de; van Schilfgaarde, R. *Biomaterials* **1997**, 18, 273–278.
- (231) Prokop, A.; Wang Taylor G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, 831, 223–231.
- (232) a) Grasdalen, H.; Larsen, B.; Smidsrød, O. *Carbohydr. Res.* **1979**, 68, 23–31.
b) Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1983**, 118, 255–260.
- (233) De, S. *J. Control. Release* **2003**, 89, 101–112.
- (234) Rehm, B. H. A., Ed. *Alginates: Biology and Applications; Microbiology Monographs* 13; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**.

- (235) Deng, K. L.; Zhong, H. B.; Tian, T.; Gou, Y.; Li, Q.; Dong, L. R. *Express Polym. Lett.* **2010**, 4, 773–780.
- (236) Lei, J.; Kim, J.-H.; Jeon, Y. S. *Macromol. Res.* **2008**, 16, 45–50.
- (237) Sack, U. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*, De Gruyter, **2016**.
- (238) Pomogaĭlo, A. D.; Dzhardimalieva, G. I. *Nanostructured materials preparation via condensation ways*, Springer, **2014**.
- (239) Pujala, R. K. *Dispersion stability, microstructure and phase transition of anisotropic nanodiscs*, Springer, **2014**.
- (240) a) McDonald, T. O.; Qu, H.; Saunders, B. R.; Ulijn, R. V. *Soft Matter* **2009**, 5, 1728–1734.
b) Thornton, P. D.; Mart, R. J.; Webb, S. J.; Ulijn, R. V. *Soft Matter* **2008**, 4, 821–827.
- (241) Rozenberg, M.; Shoham, G. *Biophys. Chem.* **2007**, 125, 166–171.
- (242) Sartori, C.; Finch, D. S.; Ralph, B.; Gilding, K. *Polymer* **1997**, 38, 43–51.
- (243) Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1767, 1073–1101.
- (244) Benninghoven, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1023–1043.
- (245) Tam, S. K.; Dusseault, J.; Polizu, S.; Ménard, M.; Hallé, J.-P.; Yahia, L. *Biomaterials* **2005**, 26, 6950–6961.
- (246) Biochrom AG. Dulbecco's MEM (DMEM): Composition of the Dulbecco's MEM medium.
http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/englisch/BC_catalogue_42_43_DMEDM.pdf (02.11.2016)
- (247) Galant, C.; Kjøniksen, A.-L.; Nguyen, Giao T. M.; Knudsen, K. D.; Nyström, B. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 190–195.
- (248) Perkin Elmer. Cell Proliferation Assay by Using MicroBeta Cell Proliferation Assay by Using MicroBeta 3H-Thymidine Incorporation.
http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/APP_Radiolabeled_Thymidine_Cell_Proliferation.pdf (02.11.2016)
- (249) Rafiee, A.; Alimohammadian, M. H.; Gazori, T.; Riazi-rad, F.; Fatemi, Seyed Mohammad Reza; Parizadeh, A.; Haririan, I.; Havaskary, M. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, 4, 372–377.
- (250) Moghimi, Symonds, P.; Murray, J.; Hunter, A.; Debska, G.; Szewczyk, A. *Mol. Ther.* **2005**, 11, 990–995.
- (251) a) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 45, 268–275
b) Fischer, D.; Bieber, T.; Li, Y.; Elsässer, H. P.; Kissel, T. *Pharm. Res.* **1999**, 16, 1273–1279;
- (252) Chua, P.-H.; Neoh, K.-G.; Kang, E.-T.; Wang, W. *Biomaterials* **2008**, 29, 1412–1421.
- (253) Sæther, H. V.; Holme, H. K.; Maurstad, G.; Smidsrød, O.; Stokke, B. T. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 74, 813–821.
- (254) Vold, Inger Mari Nygård; Kristiansen, K. A.; Christensen, B. E. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2136–2146.
- (256) Halstenberg, S.; Panitch, A.; Rizzi, S.; Hall, H.; Hubbell, J. A. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 710–723.
- (256) Rodriguez, C. A.; Papanastasiou, E. A.; Juba, M.; Bishop, B. *Front. Chem.* **2014**, 2, 1–8.
- (257) Du, A. W.; Stenzel, M. H. *Biomacromolecules* **2014**, 15, 1097–1114.
- (258) Dittmer, J. C.; Lester, R. L. *J. Lipid Res.* **1964**, 5, 126–127.

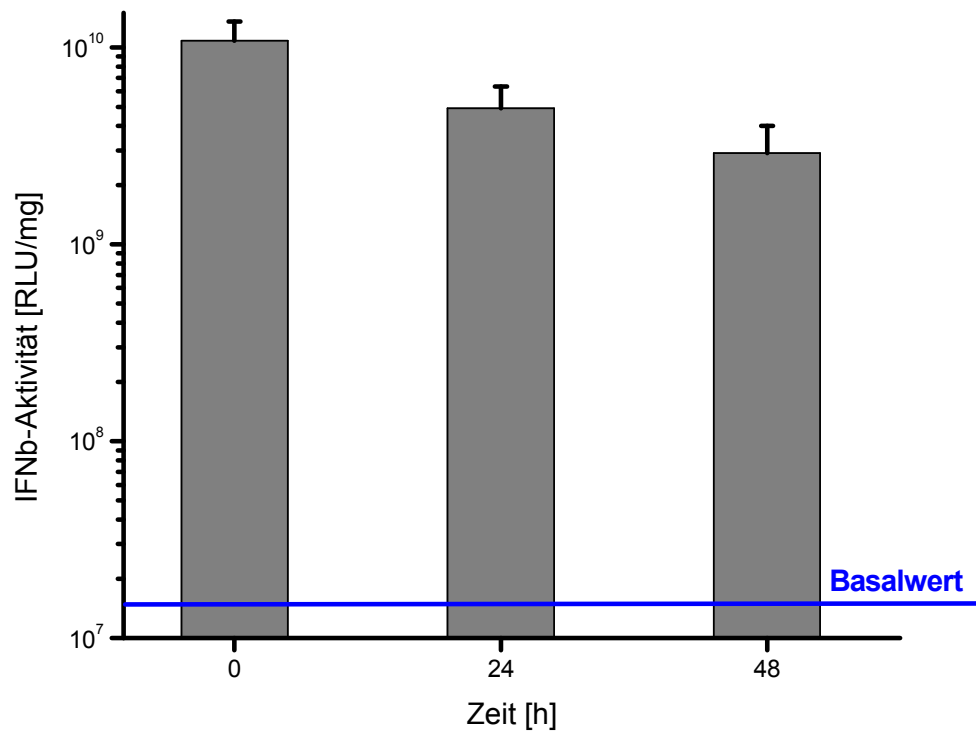
10. Anhang



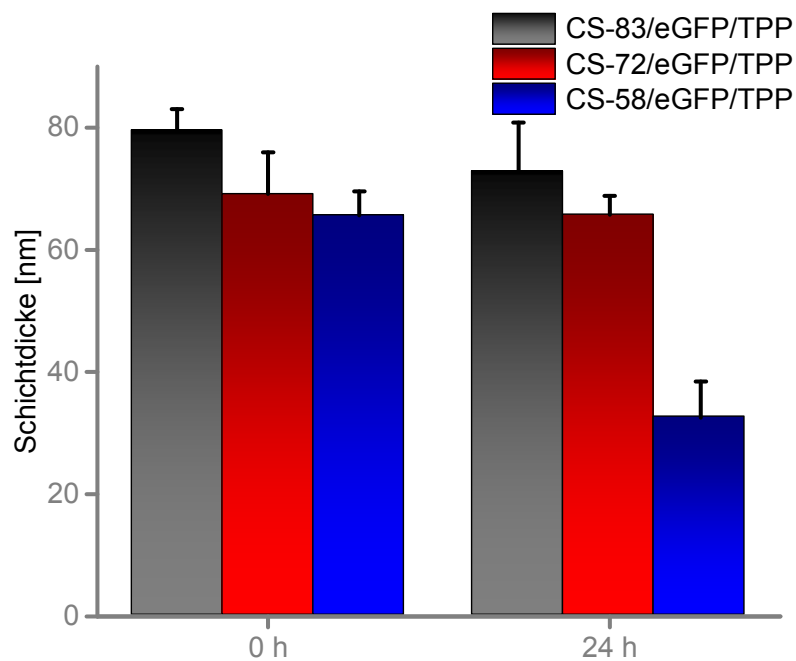
Anhang 10-1 Stabilitätsuntersuchungen der CS/TPP-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in AcOH, Volumenverhältnis 3:1) durch Dynamische Lichtstreuexperimente anhand der Partikelgrößenänderung. Die Proben wurden bei 37 °C über den gezeigten Zeitraum inkubiert.



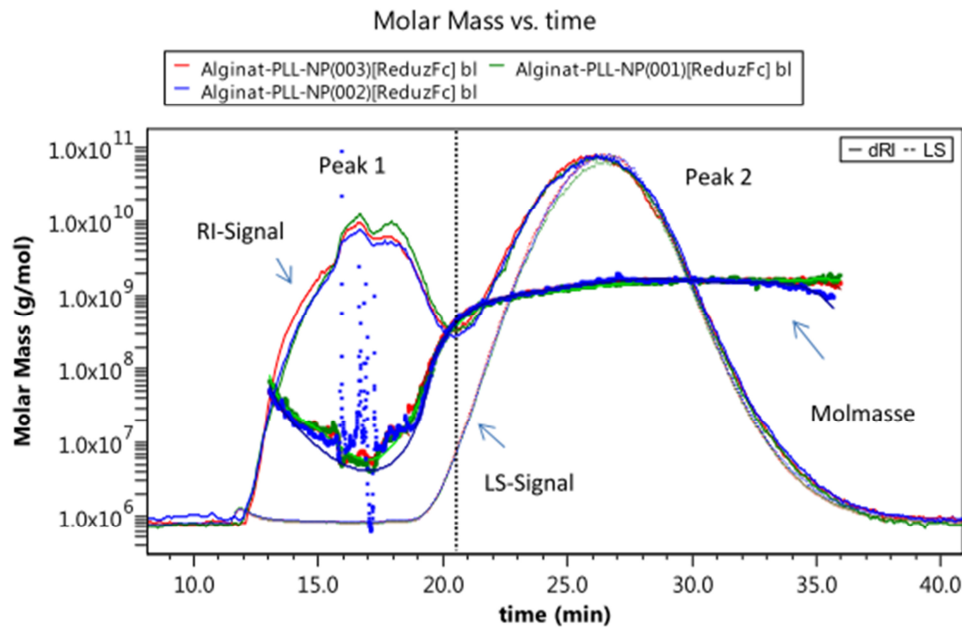
Anhang 10-2 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der drei CS/TPP-Beschichtungen CS-83/TPP, CS-72/TPP und CS-58/TPP auf Siliziumwafern (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 µL. n = 4.



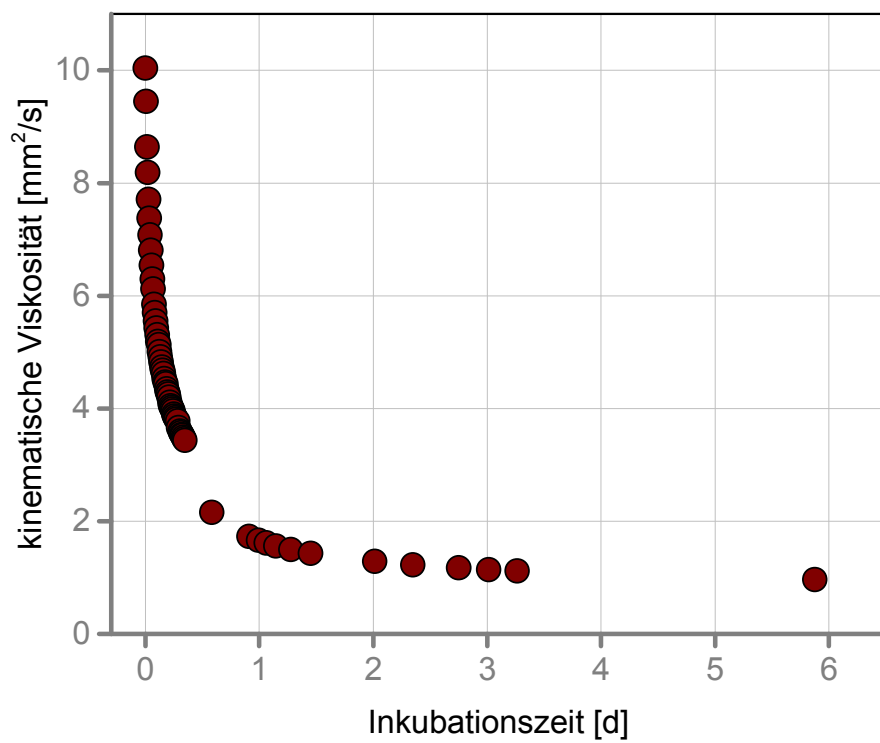
Anhang 10-3 Aktivitätsverlust von 100 U/mL IFN β über einen Zeitraum von 48 h.



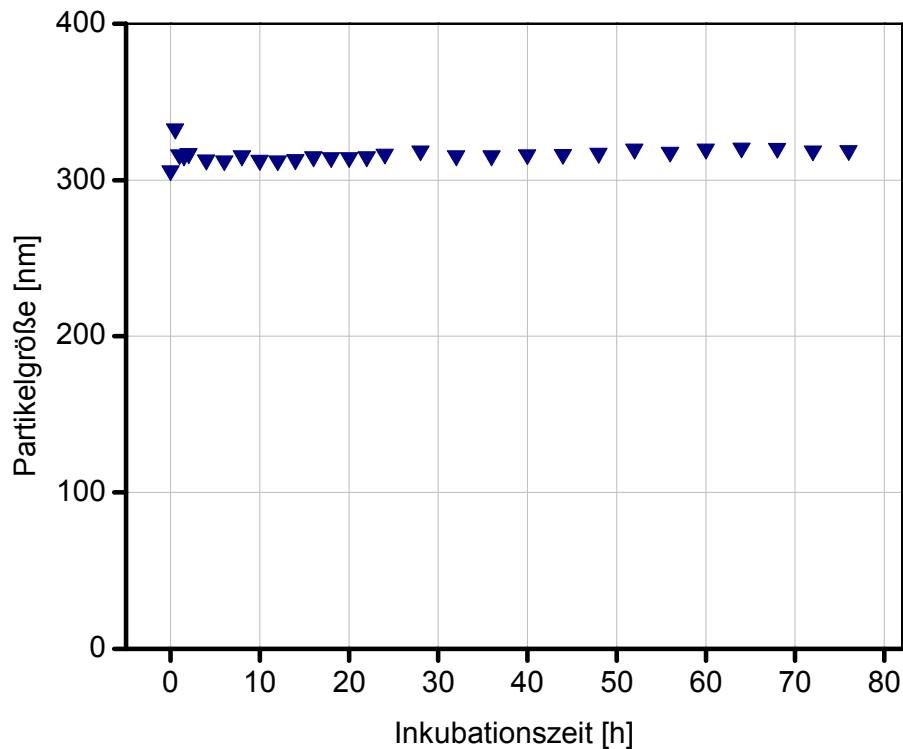
Anhang 10-4 Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Inkubation der mit Chitosan/eGFP/Tripolyphosphat-Nanopartikeln (CS-83, CS-72 und CS-58) beschichteten Reintitan-Substrate (medizinische Qualität 4) in Reinstwasser bei 37 °C (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis 3:1, $2,94 \times 10^{-5}$ μ mol eGFP pro Plättchen). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 3.



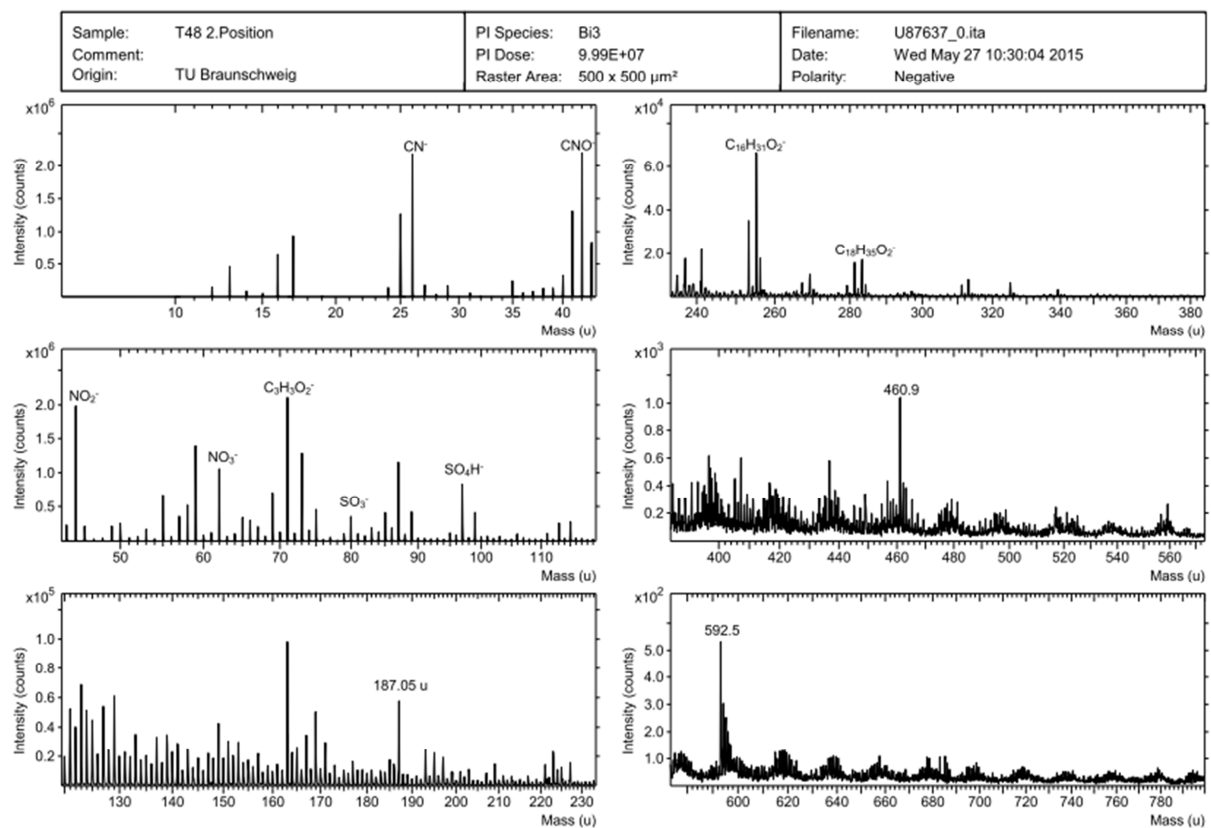
Anhang 10-5 AF4-Elugramm der Alginat/ α PLL-Nanopartikel mit normalisierten RI-Signalen und Molmassen in Abhängigkeit der Elutionszeit ((je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1).



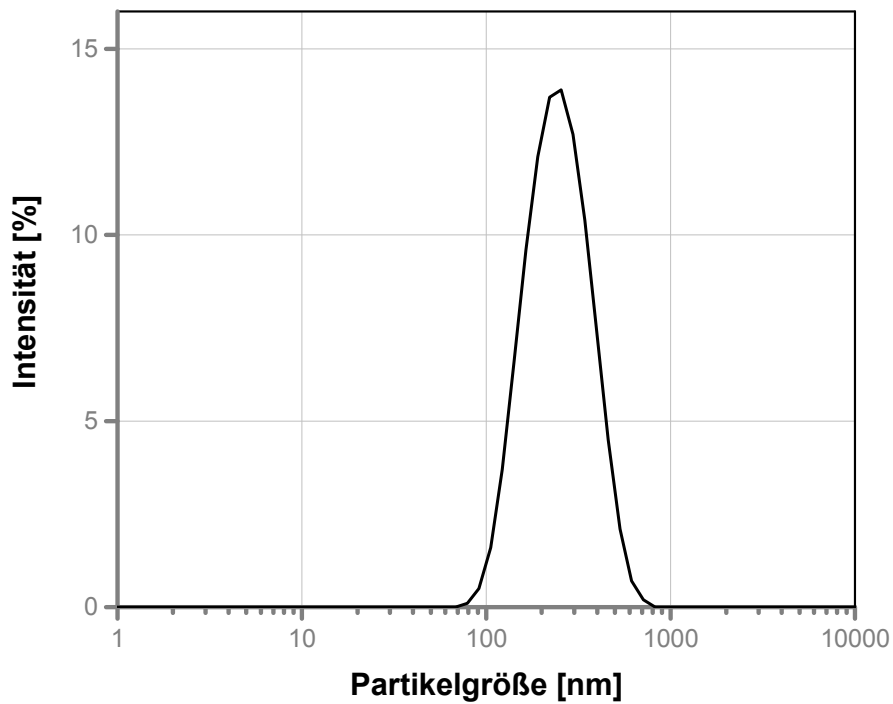
Anhang 10-6 Viskositätsmessung einer 10 mg/mL konzentrierten Natriumalginatlösung in Gegenwart von 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Alginat-Lyase.



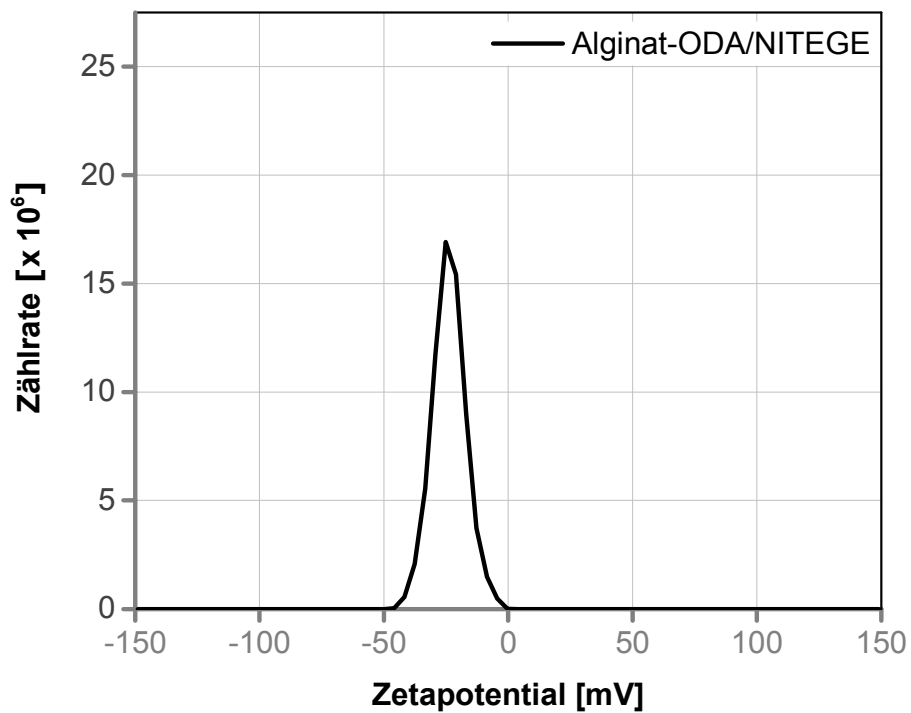
Anhang 10-7 Stabilitätsuntersuchungen der Alg/ α PLL-Nanopartikelsuspensionen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) durch Dynamische Lichtstreuexperimente anhand der Partikelgrößenänderung. Die Proben wurden bei 37 °C über den gezeigten Zeitraum inkubiert.



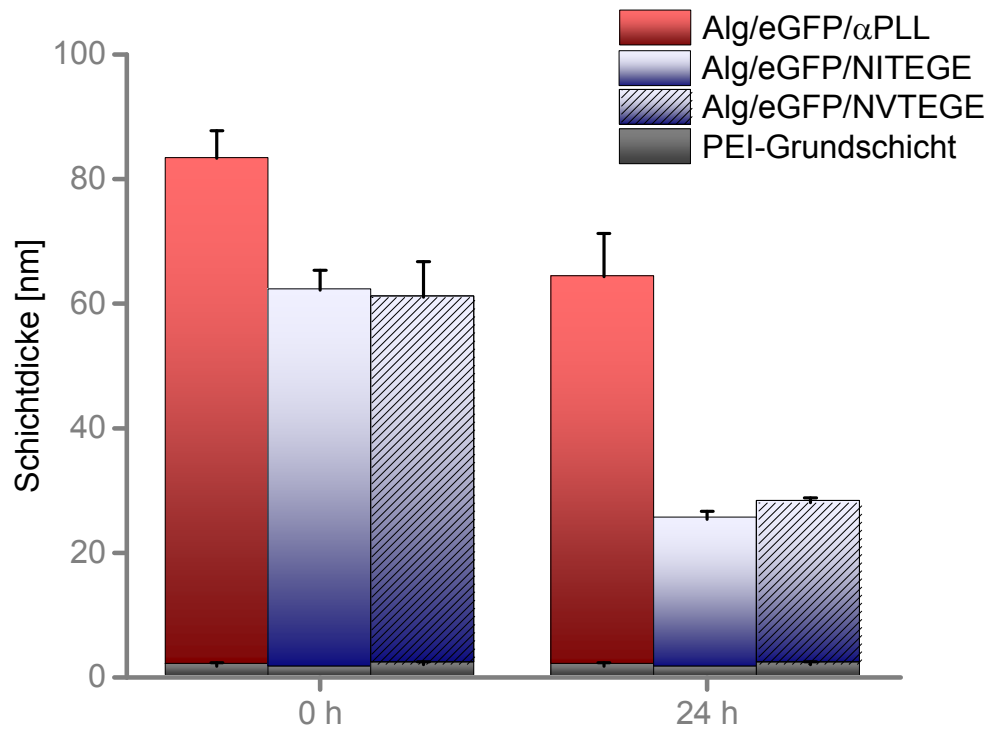
Anhang 10-8 ToF-SIMS-Spektrum des Quadranten III mit Alginat/ α PLL. Dargestellt sind die Spektren der negativ polarisierten Ionen bis $m/z = 800$.



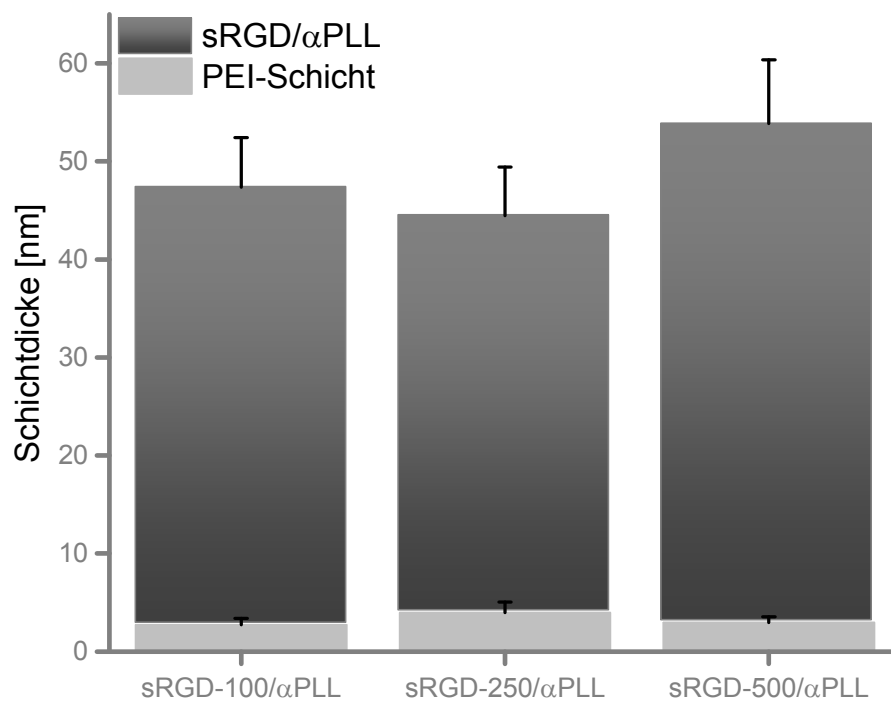
Anhang 10-9 Intensitätsverteilung von Alginate-ODA/NITEGE-Partikeln mit einem ODA-Substitutionsgrad von 12 % (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1-Verhältnis).



Anhang 10-10 Zetapotential der Alg-ODA/NITEGE-Nanopartikel mit einem ODA-Substitutionsgrad von 12 % (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 1:1).

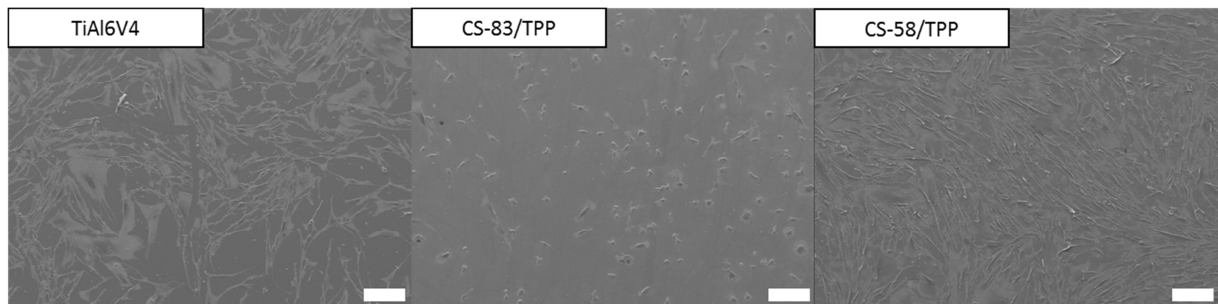
**Anhang 10-11**

Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der Inkubation der mit Alginat/eGFP/Peptid-Nanopartikeln (α PLL, NITEGE und NVTEGE) beschichteten Reintitan-Substrate (medizinische Qualität 4) in Reinstwasser bei 37 °C (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnisse 4:1 für Alg/ α PLL und 1:1 für Alg/Ni(V)TEGE, $2,94 \times 10^{-5}$ μ mol eGFP pro Plättchen). Die Beschichtungsdauer von 3 Minuten entspricht in etwa 20 μ L. n = 3.

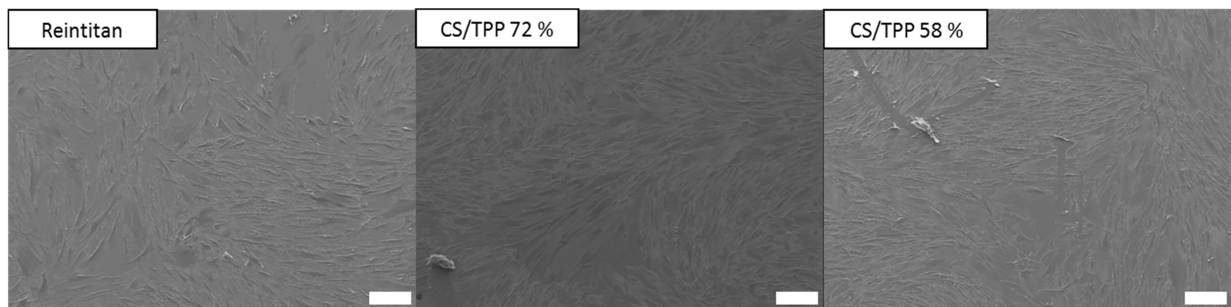
**Anhang 10-12**

Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der sRGD/ α PLL-Beschichtungen (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis 4:1) mit PEI-Grundschrift. Die Reintitan-Substrate wurden mit der PEI-Grundschrift (5 % w/w) in einem einminütigen Tauchprozess versehen, bevor eine dreiminütige Sprühbeschichtung (etwa 20 μ L) mit den Alg/Peptid-Nanopartikeln erfolgte. n = 4.

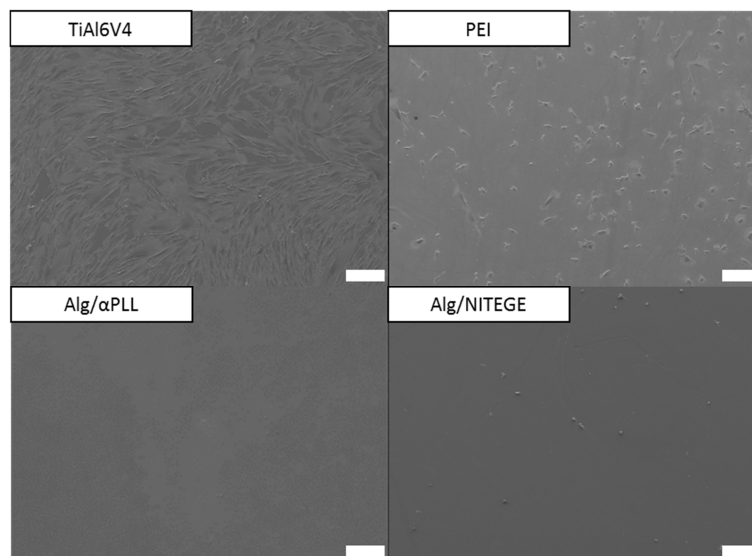
10.1 REM-Aufnahmen



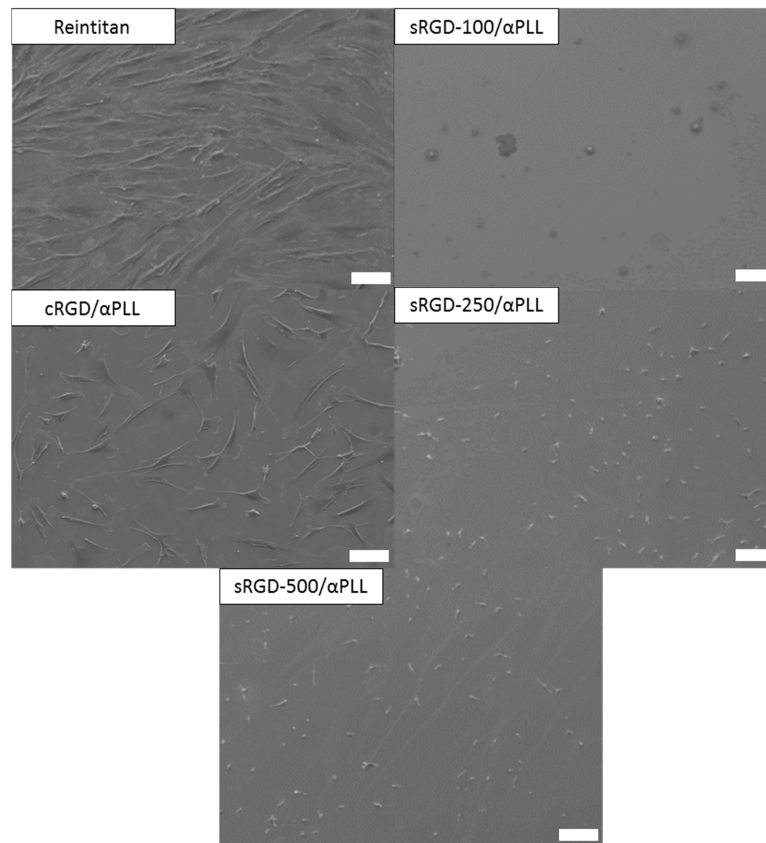
Anhang 10-13 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem TiAl6V4 und mit CS-83/TPP- und CS-58/TPP-beschichteten TiAl6V4-Legierung nach 72 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.



Anhang 10-14 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem Reintitan und mit CS-83/TPP- und CS-58/TPP-beschichteten Reintitan nach 72 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.



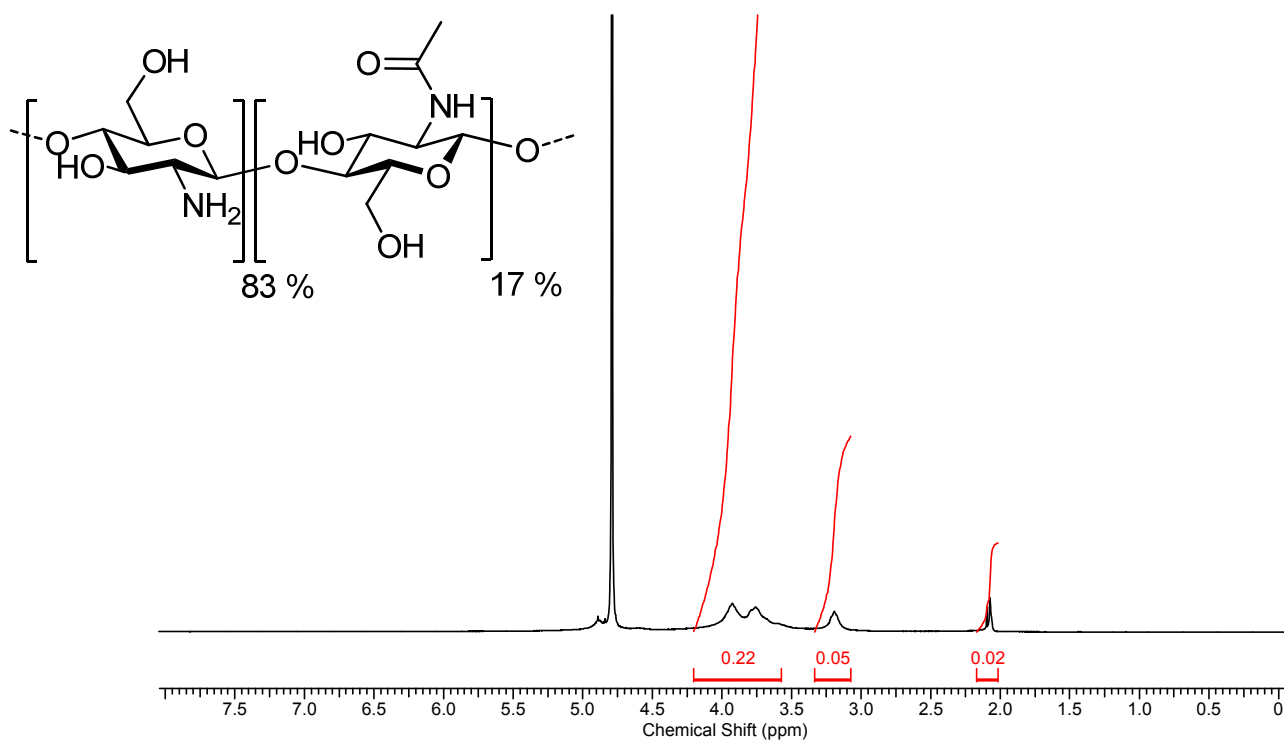
Anhang 10-15 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem TiAl6V4 (medizinische Qualität 5) und auf PEI-, Alginat/αPLL- und Alginat/NITEGE-Beschichtungen des TiAl6V4 nach 72 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 µm.



Anhang 10-16 REM-Aufnahmen der fixierten humanen Gingivafibroblasten auf unbeschichtetem Reintitan (medizinische Qualität 4) und auf cRGD-Alginat/ α PLL- und sRGD-Alginat/ α PLL-Beschichtungen des Reintitans nach 72 h Inkubationszeit. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

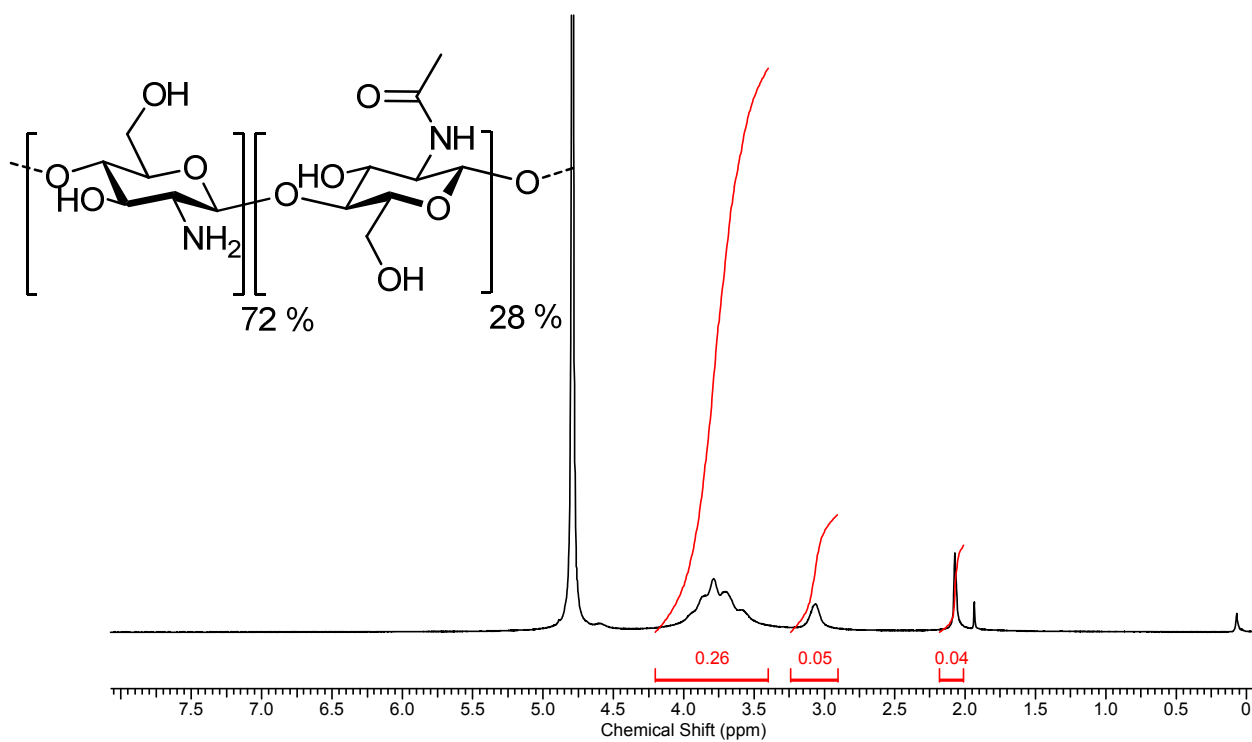
10.2 ^1H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR-Spektren

Chitosan-83 (83% Deacetylierungsgrad)

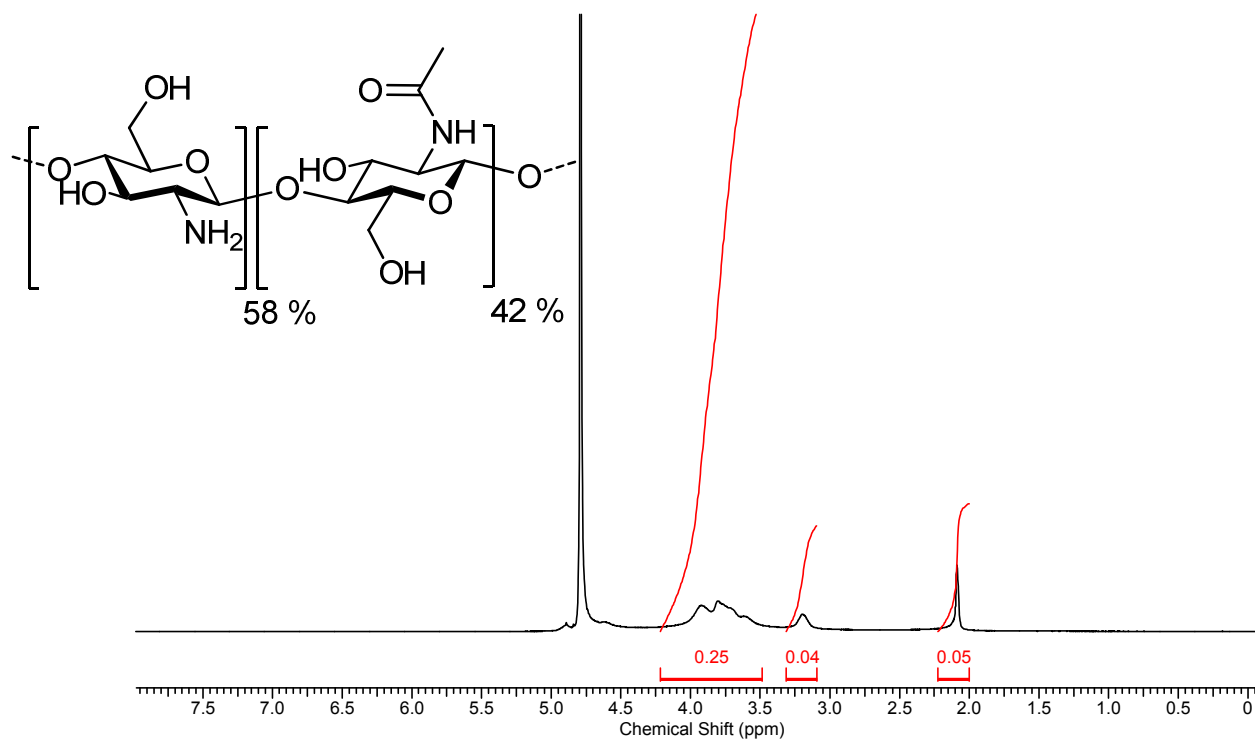
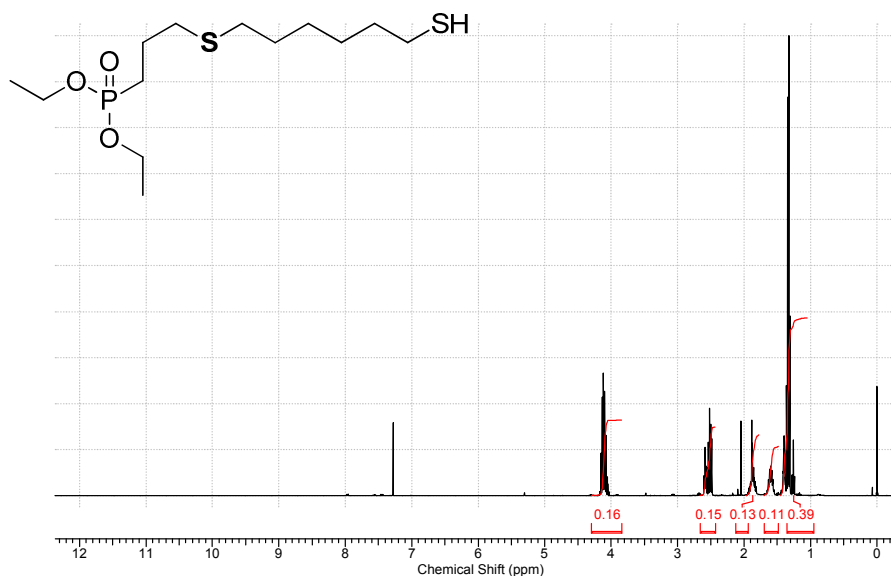


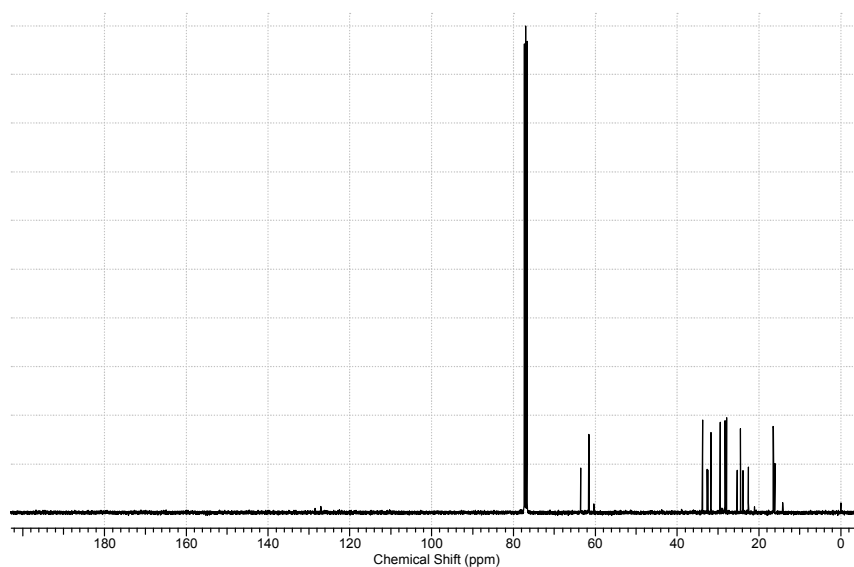
Anhang 10-17 ^1H -NMR-Spektrum von Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 83 % in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1)

Chitosan-72 (72 % Deacetylierungsgrad)

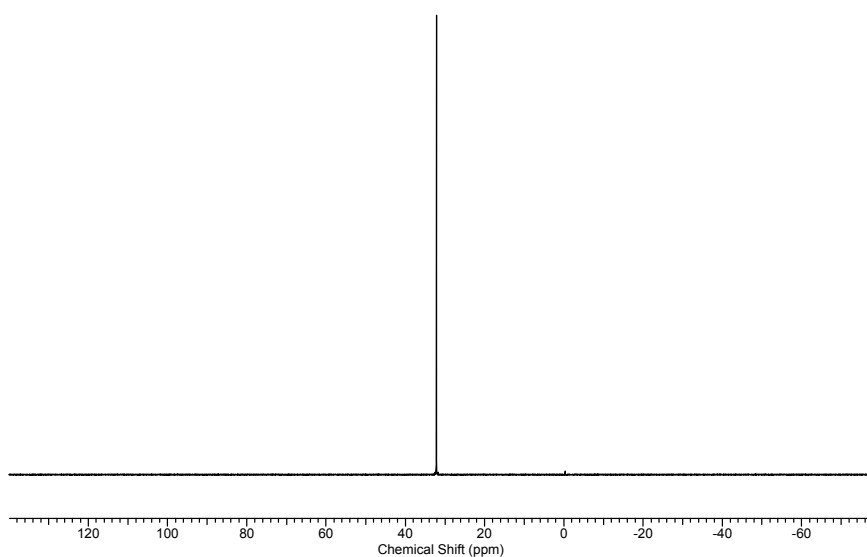


Anhang 10-18 ^1H -NMR-Spektrum von Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 72 % in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1).

Chitosan-58 (58 % Deacetylierungsgrad)**Anhang 10-19** ^1H -NMR-Spektrum von Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 58 % in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1).**Diethyl(3-((6-mercaptohexyl)thio)propyl)phosphonat 5a****Anhang 10-20** ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung 5a in CDCl_3 .

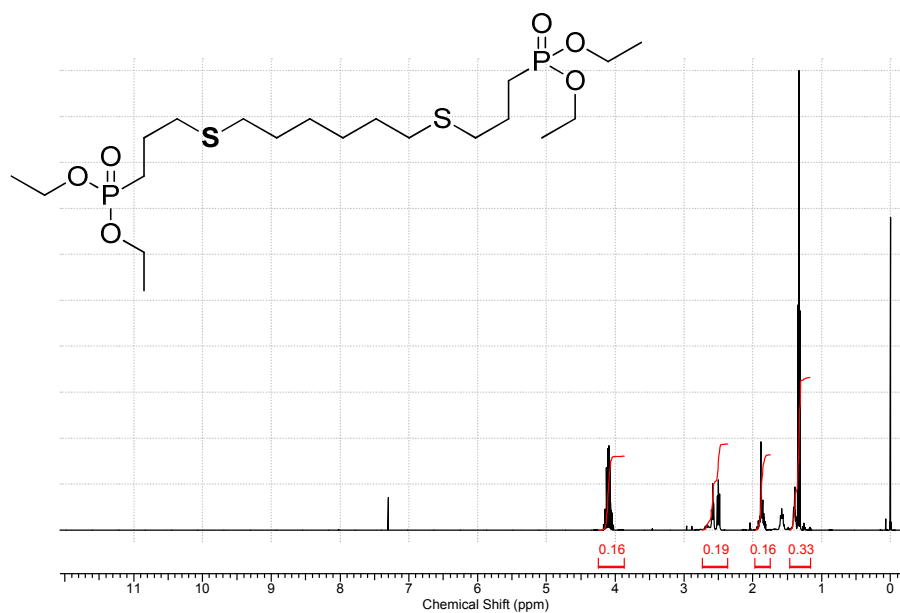


Anhang 10-21 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **5a** in CDCl_3 .

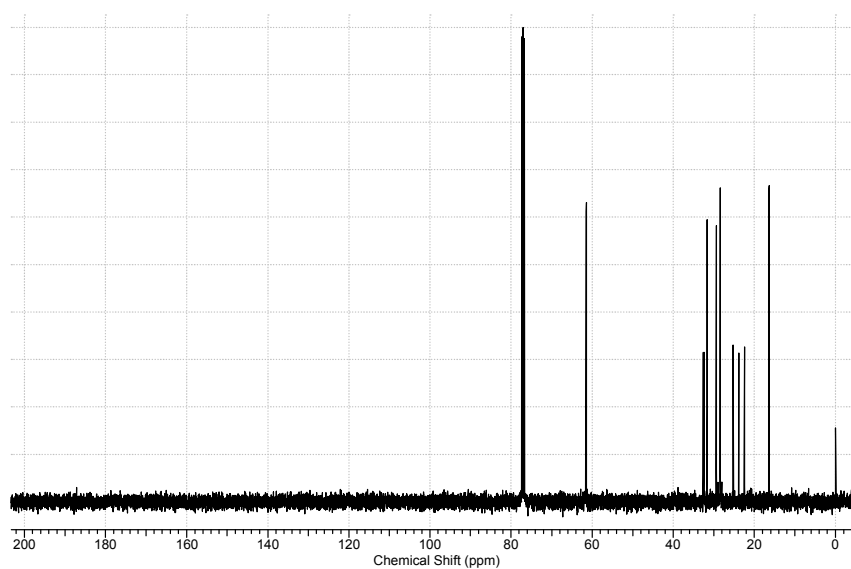


Anhang 10-22 ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **5a** in CDCl_3 .

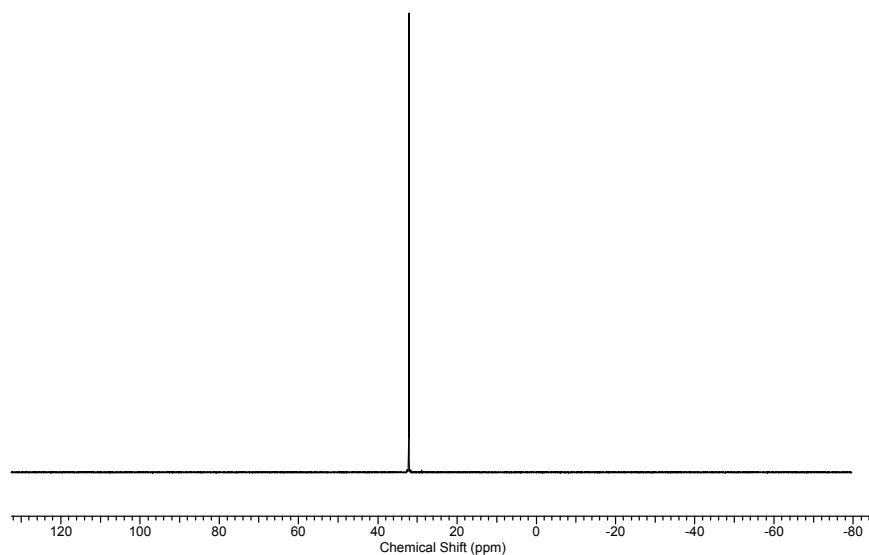
Tetraethyl((hexan-1,6-diylbis(sulfandiyl))bis(propan-3,1-diyl))bis(phosphonat) 3a



Anhang 10-23 ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **3a** in CDCl_3 .

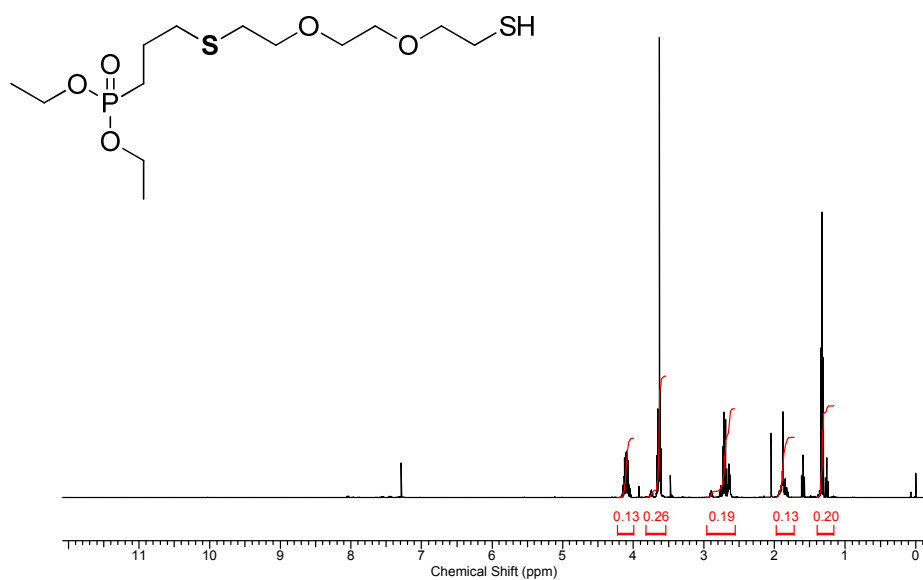


Anhang 10-24 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **3a** in CDCl_3 .

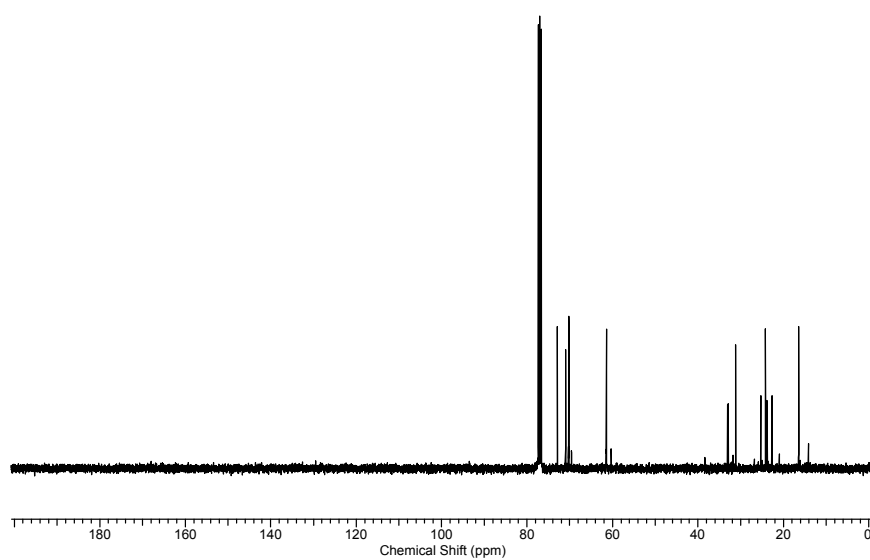


Anhang 10-25 ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **3a** in CDCl_3 .

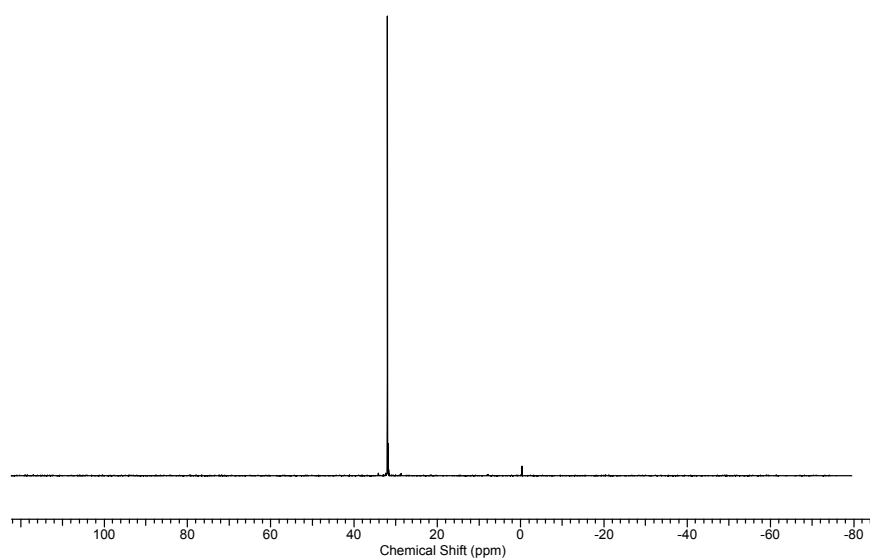
Diethyl(3-((2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)thio)propyl)phosphonat **5b**



Anhang 10-26 ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **5b** in CDCl_3 .

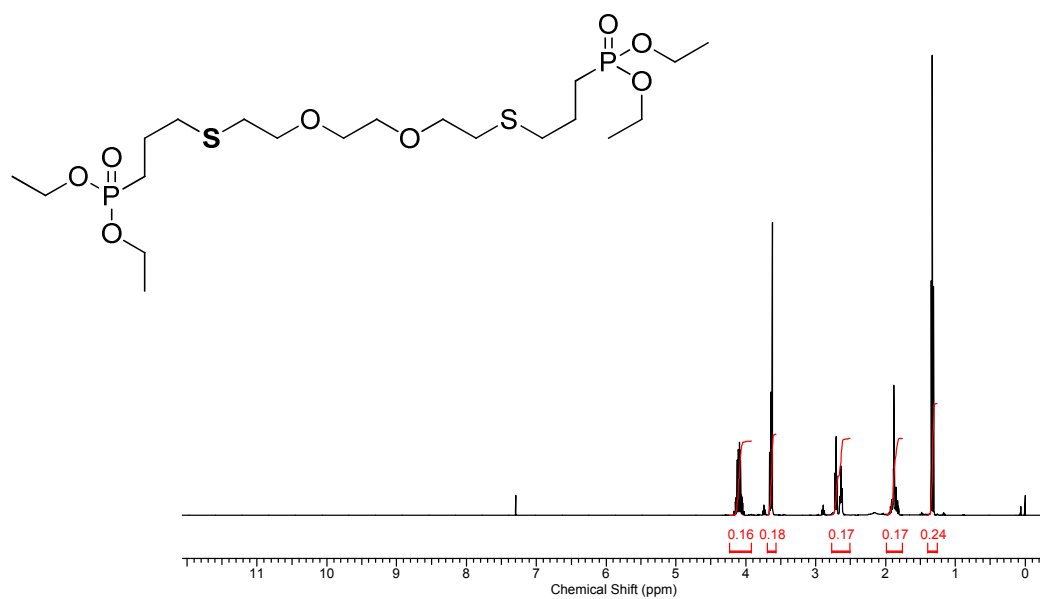


Anhang 10-27 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **5b** in CDCl_3 .

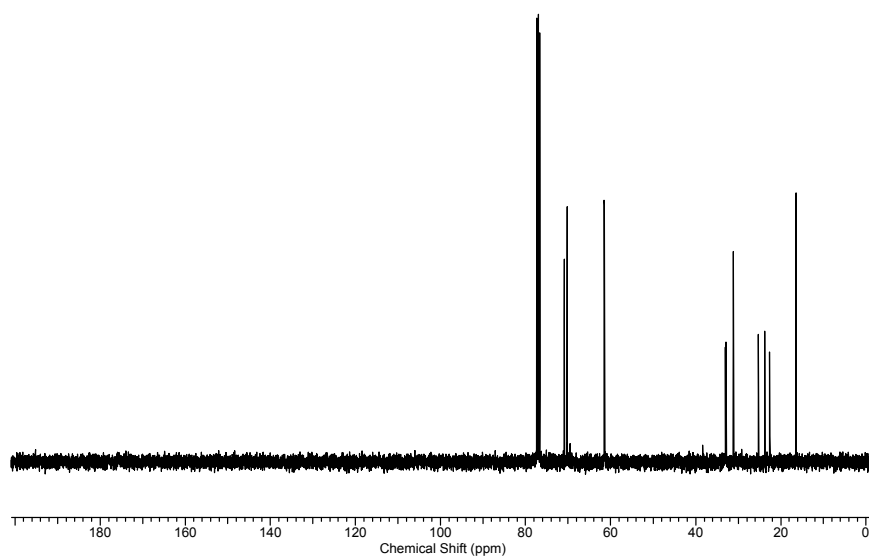


Anhang 10-28 ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **5b** in CDCl_3 .

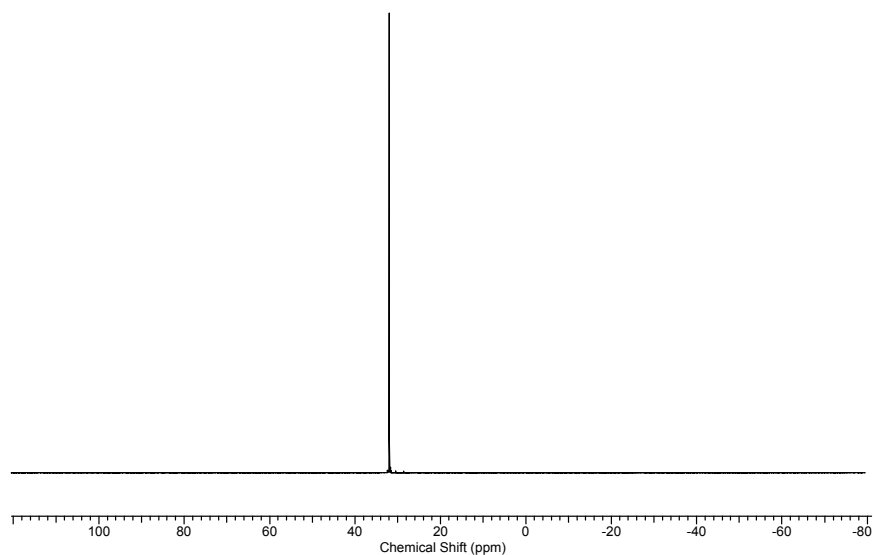
Tetraethyl-7,10-dioxa-4,13-dithiahexadecan-1,16-diylbis(phosphonat) **3b**



Anhang 10-29 ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **3b** in CDCl_3 .

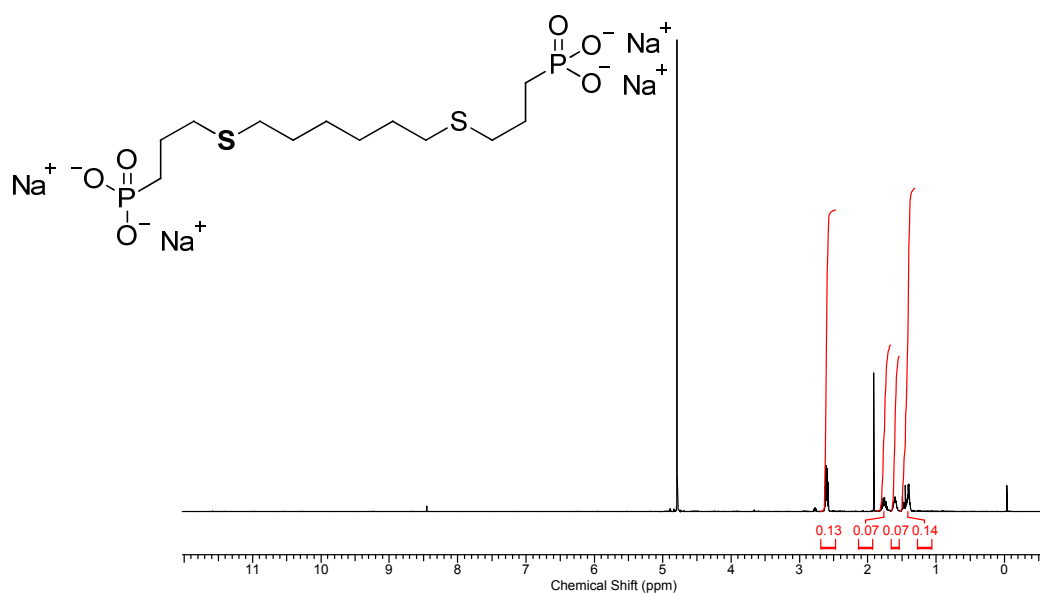


Anhang 10-30 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **3b** in CDCl_3 .

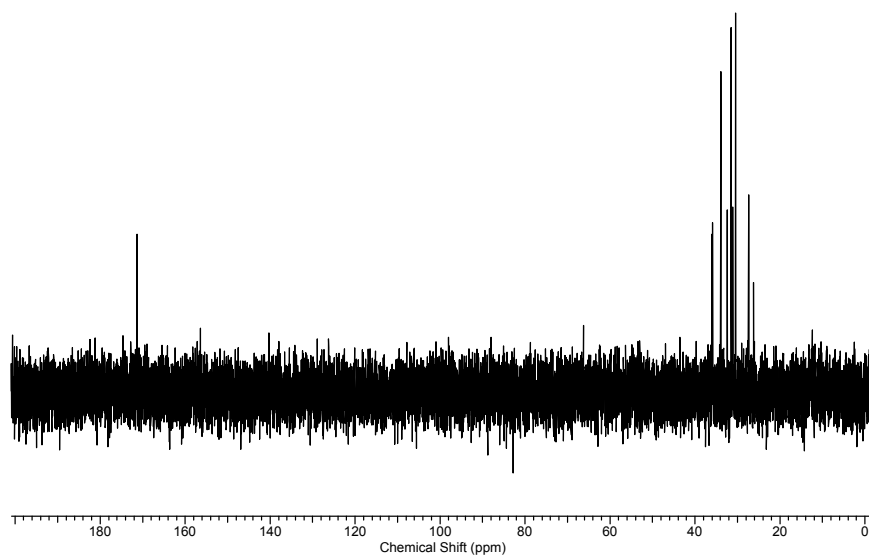


Anhang 10-31 ³¹P-NMR-Spektrum von Verbindung **3b** in CDCl₃.

Tetranatrium((hexan-1,6-diylbis(sulfandiyl))bis(propan-3,1-diyl))diphosphonsäure **4a**

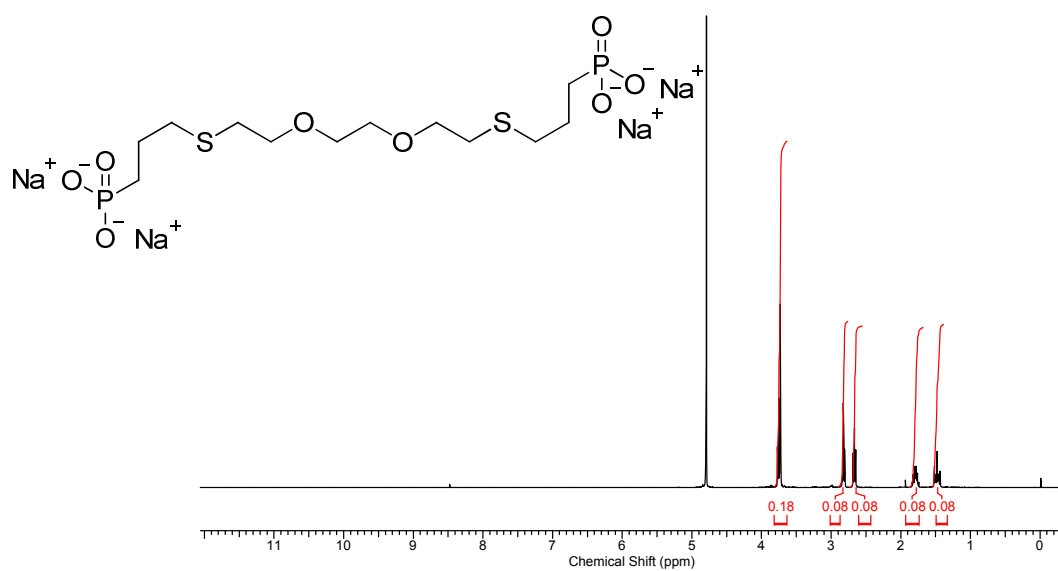


Anhang 10-32 ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **4a** in D₂O.

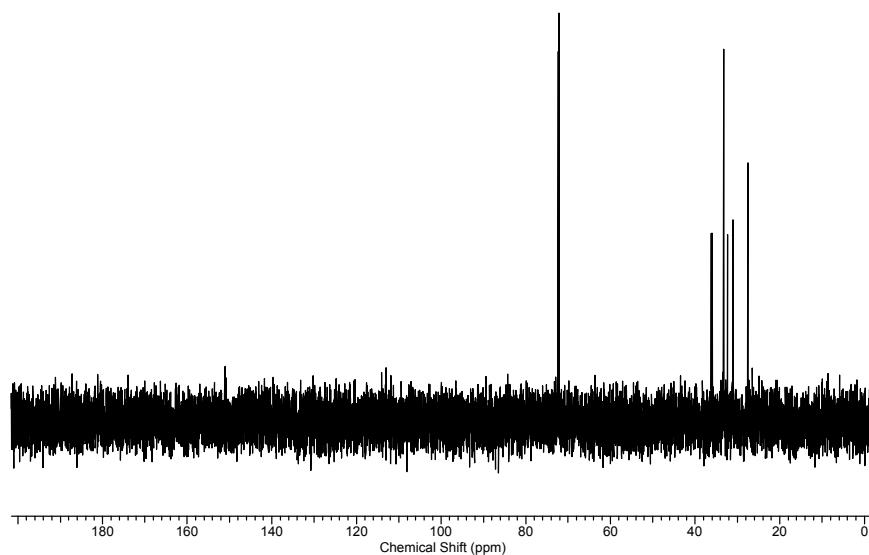


Anhang 10-33 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **4a** in D_2O .

Tetranatrium-7,10-dioxa-4,13-dithiahexadecan-1,16-diylidiphosphonsäure 4b

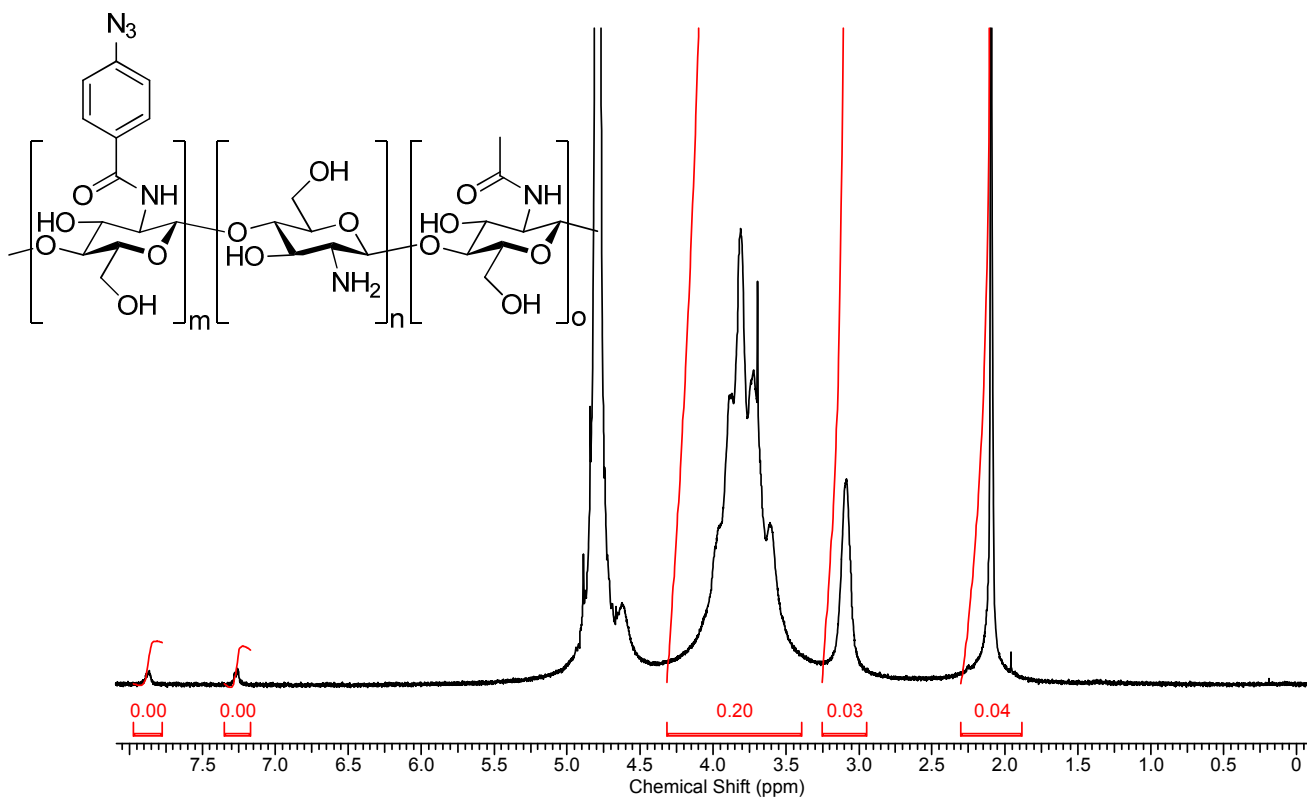


Anhang 10-34 ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **4b** in D_2O .

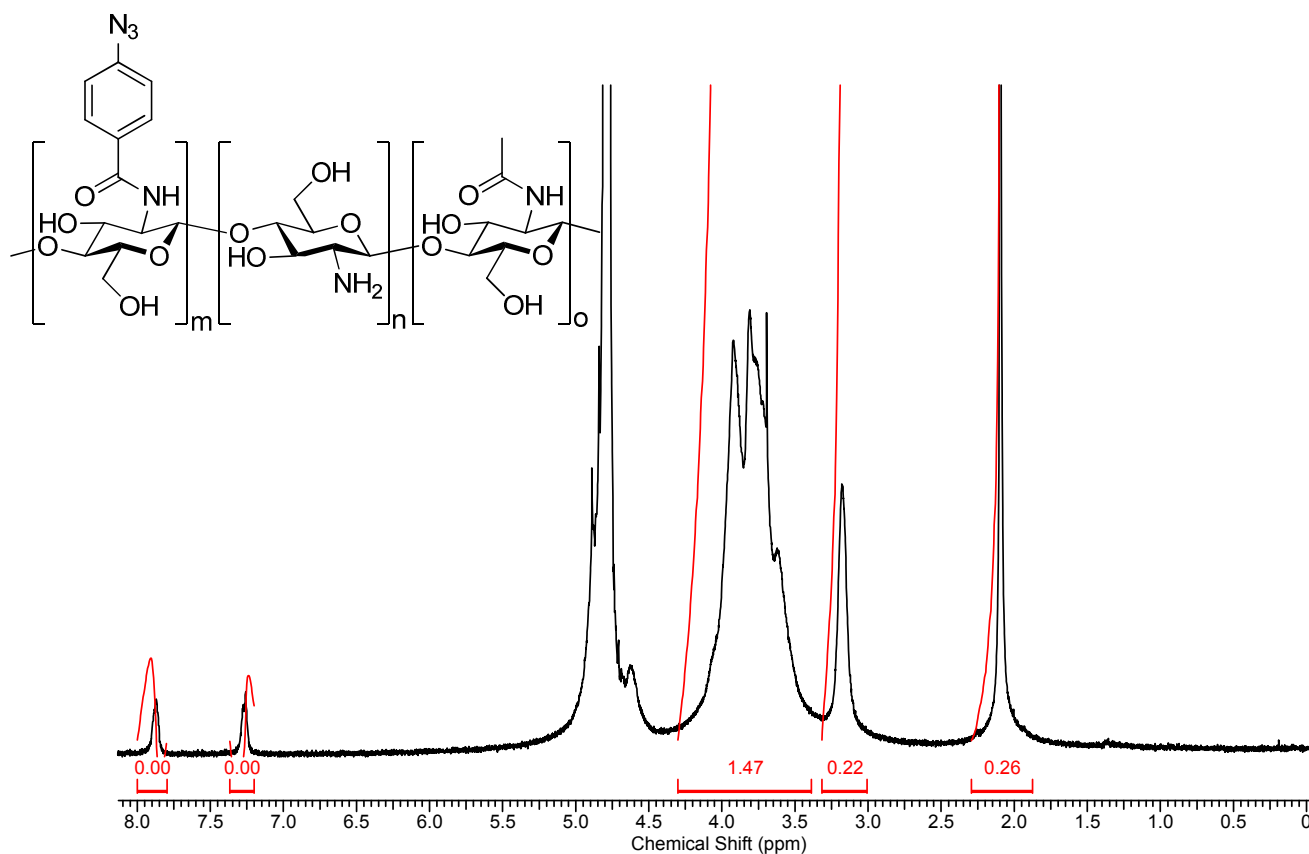
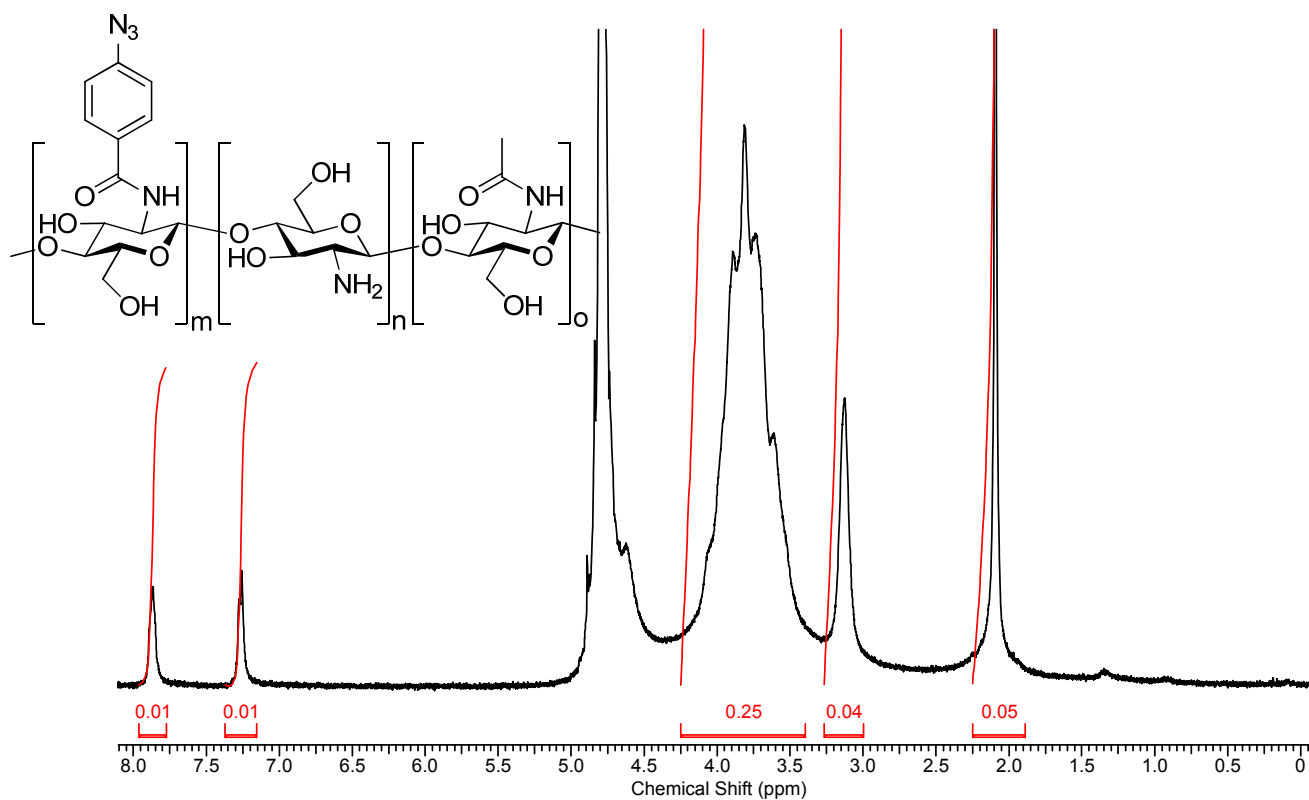


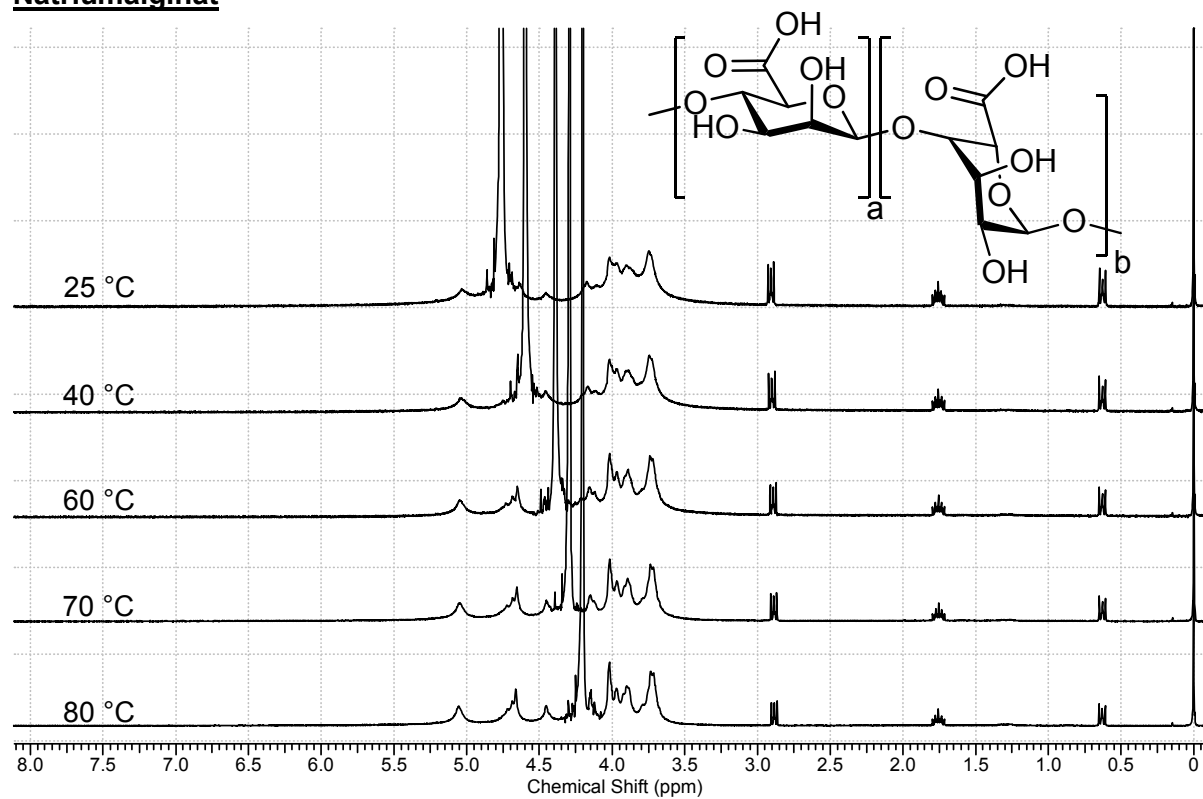
Anhang 10-35 ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **4b** in D_2O .

Chitosanarylazid-10



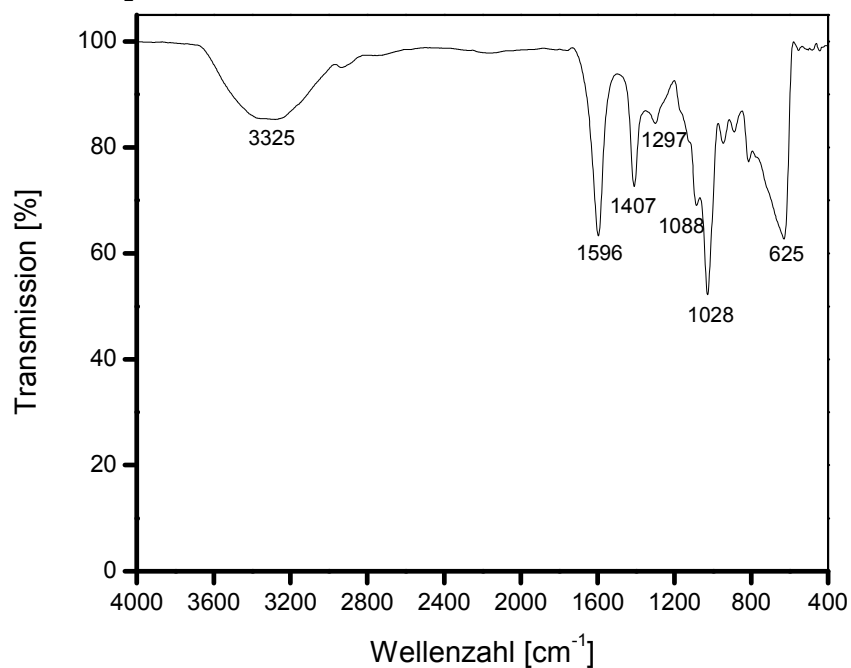
Anhang 10-36 ^1H -NMR-Spektrum von CSAzid-10 in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1)

Chitosanarylazid-20Anhang 10-37 ^1H -NMR-Spektrum von CSAzid-20 in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1)**Chitosanarylazid-30**Anhang 10-38 ^1H -NMR-Spektrum von CSAzid-30 in $\text{D}_2\text{O}/\text{DCL}$ (500:1)

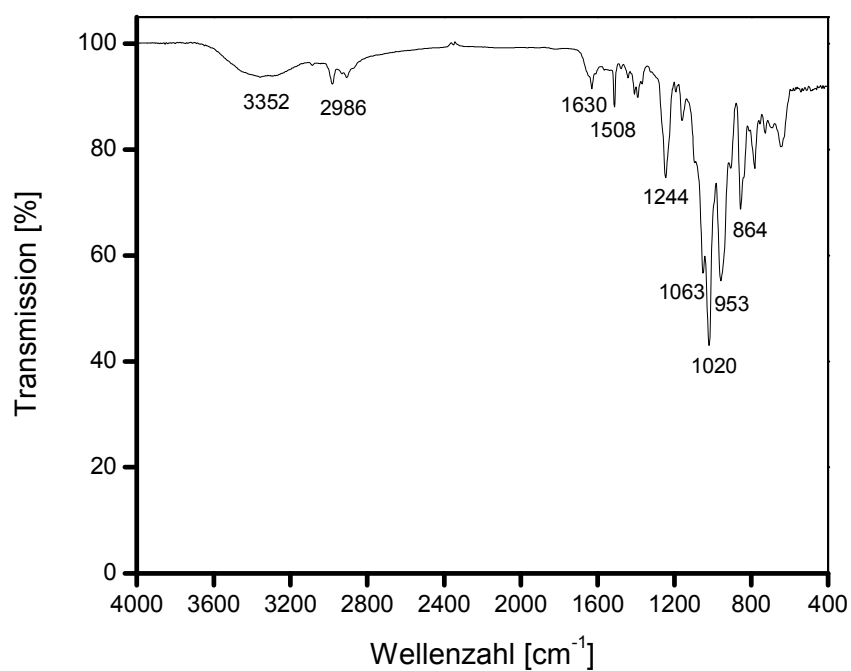
Natriumalginat

Anhang 10-39 ^1H -NMR-Spektren von aufgereinigtem Natriumalginat bei 20 °C und bei 60 °C in D_2O (+ DSS als Referenz).

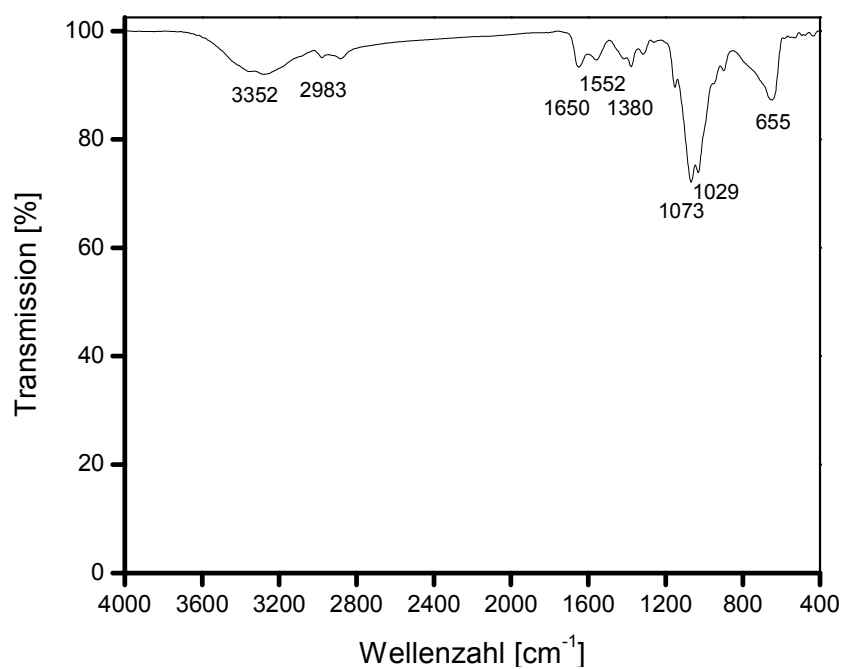
10.3 FTIR-Spektren



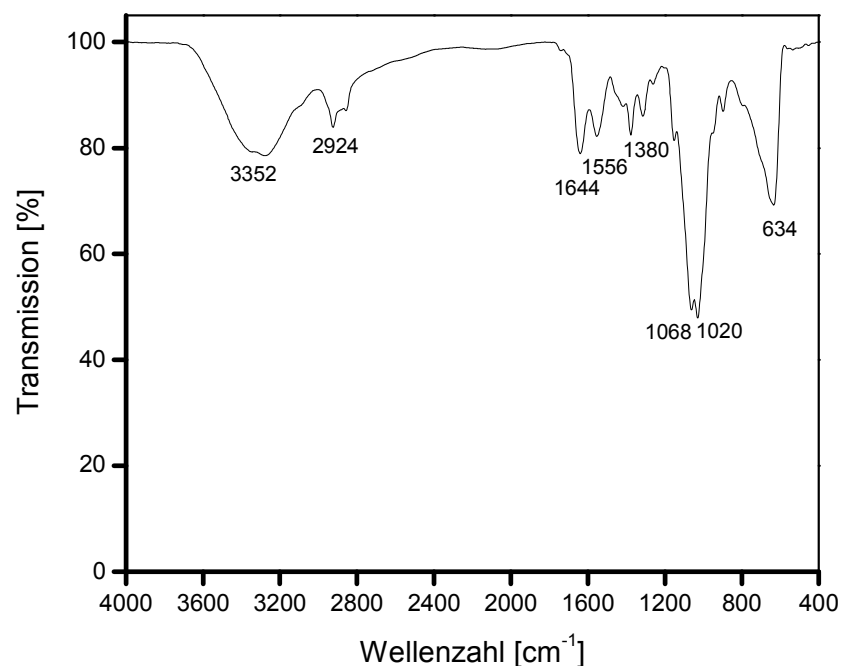
Anhang 10-40 FTIR-Spektrum von Natriumalginat (Wellenlängenbereich 4.000-400 cm⁻¹). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.



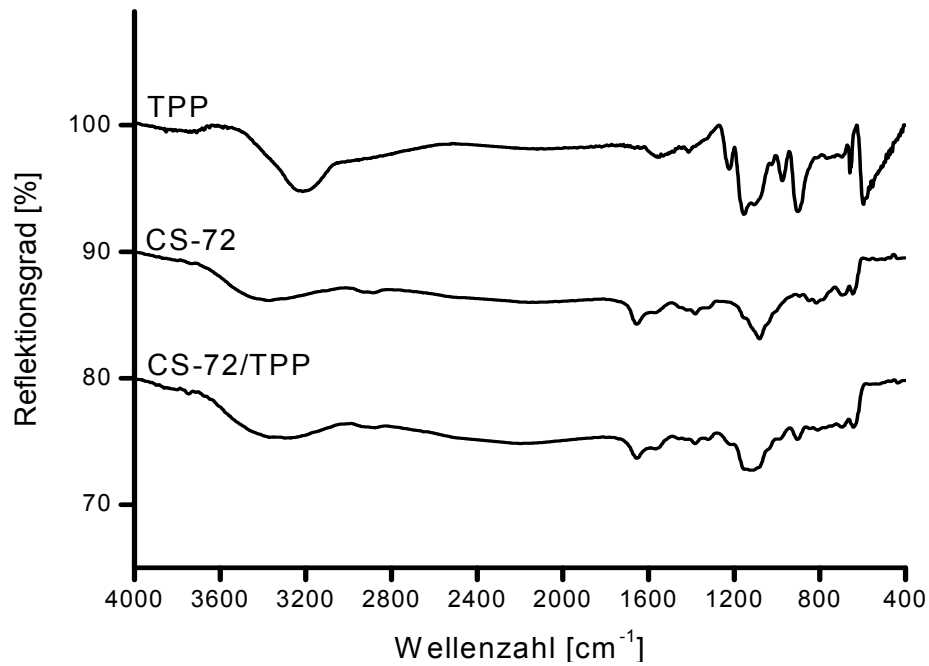
Anhang 10-41 FTIR-Spektrum von CS-58 (Wellenlängenbereich 4.000-400 cm⁻¹). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.



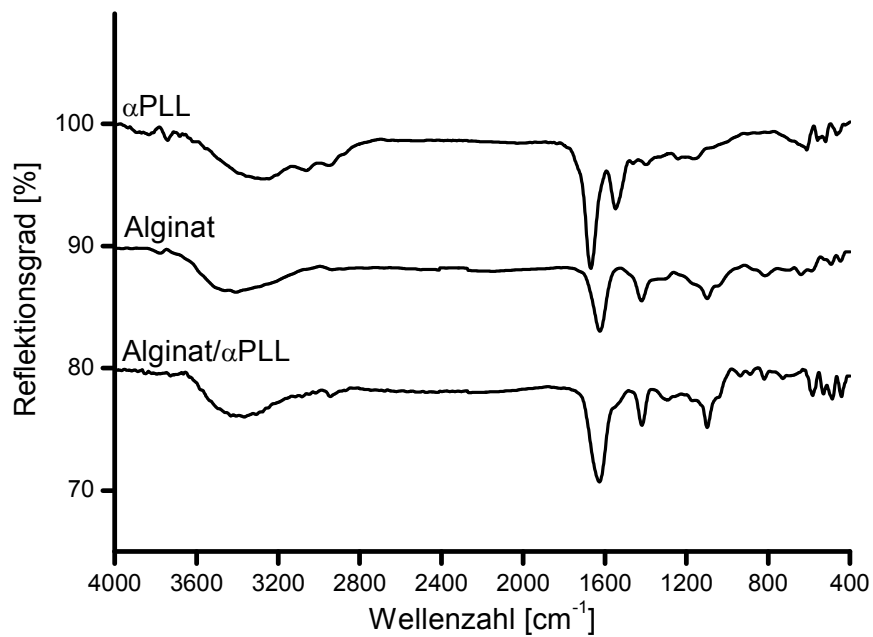
Anhang 10-42 FTIR-Spektrum von CS-72 (Wellenlängenbereich $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.



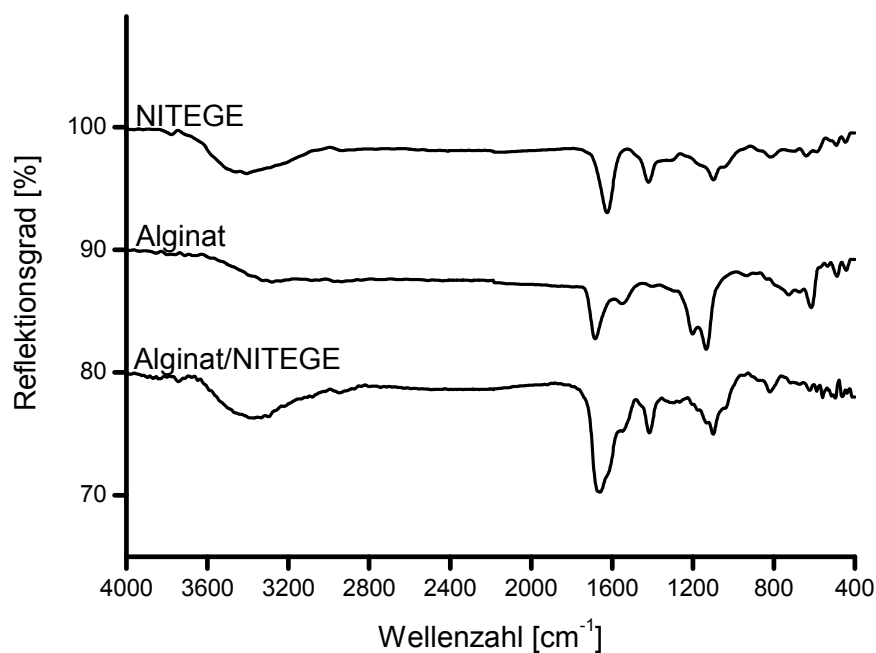
Anhang 10-43 FTIR-Spektrum von CS-83 (Wellenlängenbereich $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.



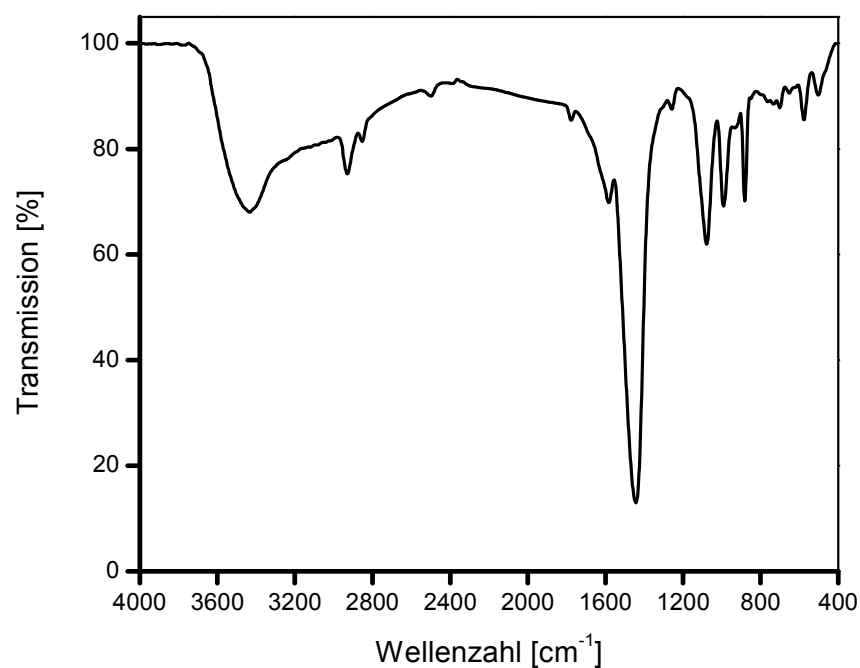
Anhang 10-44 RAIRS-Spektren der Komponenten TPP und CS-72 sowie der CS-72/TPP-Nanopartikel auf Reintitan (je 1 mg/mL in 0,1 % AcOH, Volumenverhältnis der CS-72/TPP -Nanopartikel 3:1).



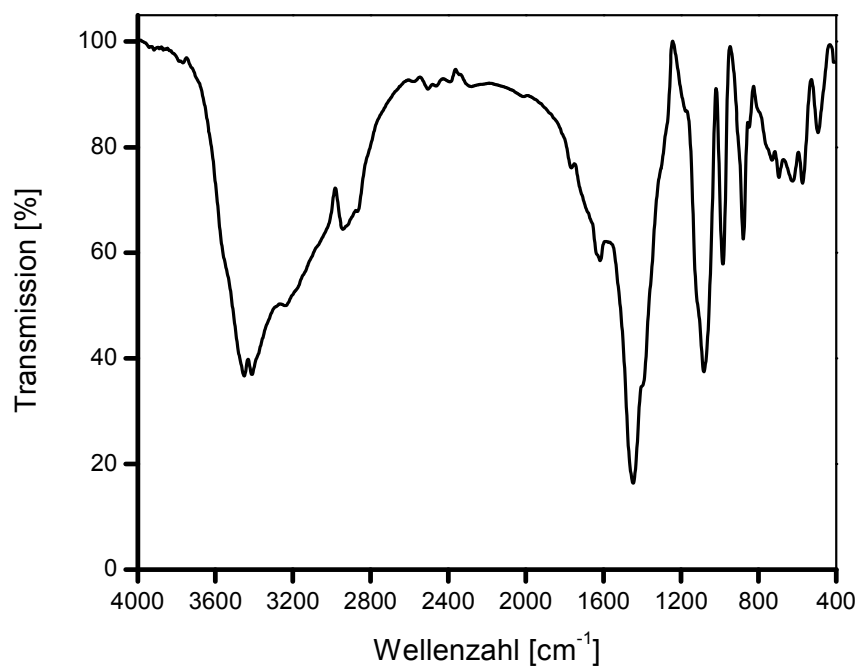
Anhang 10-45 RAIRS-Spektren der Komponenten α PLL und Alginate sowie der Alginate/ α PLL-Nanopartikel auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/ α PLL-Nanopartikel 4:1).



Anhang 10-46 RAIRS-Spektren der Komponenten NITEGE und Alginat sowie der Alginat/NITEGE-Nanopartikel auf TiAl6V4 (je 1 mg/mL in Reinstwasser, Volumenverhältnis der Alg/NITEGE-Nanopartikel 1:1).

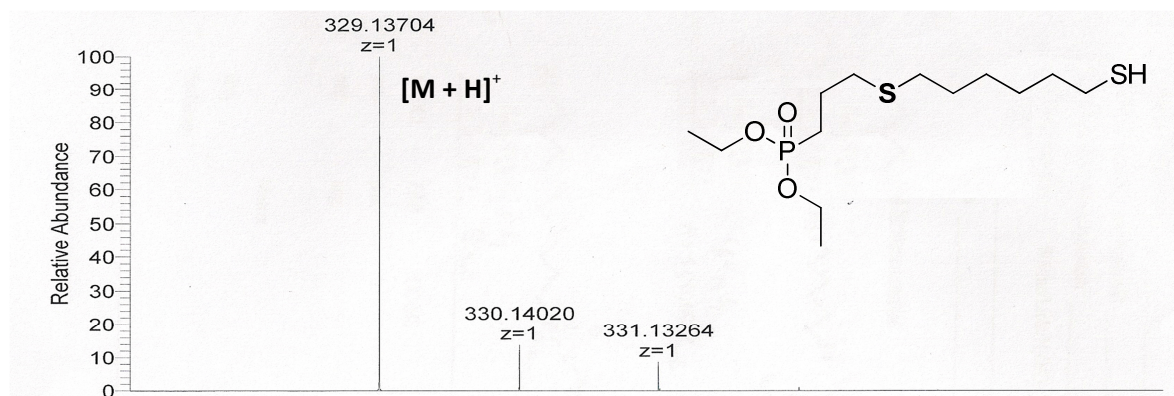


Anhang 10-47 FTIR-Spektrum von Verbindung 4a (Wellenlängenbereich 4.000-400 cm⁻¹). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.

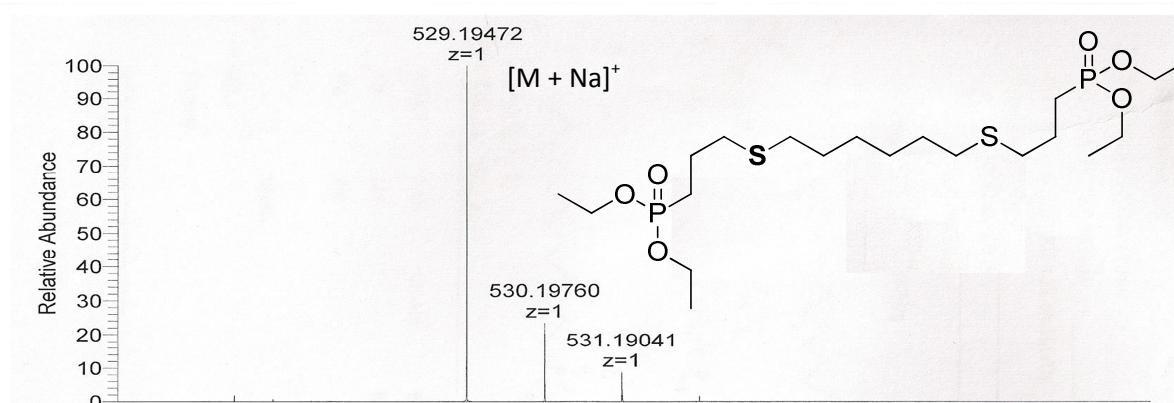
**Anhang 10-48**

FTIR-Spektrum von Verbindung 4b (Wellenlängenbereich 4.000-400 cm⁻¹). Die Probe wurde als KBr-Pressling vermessen.

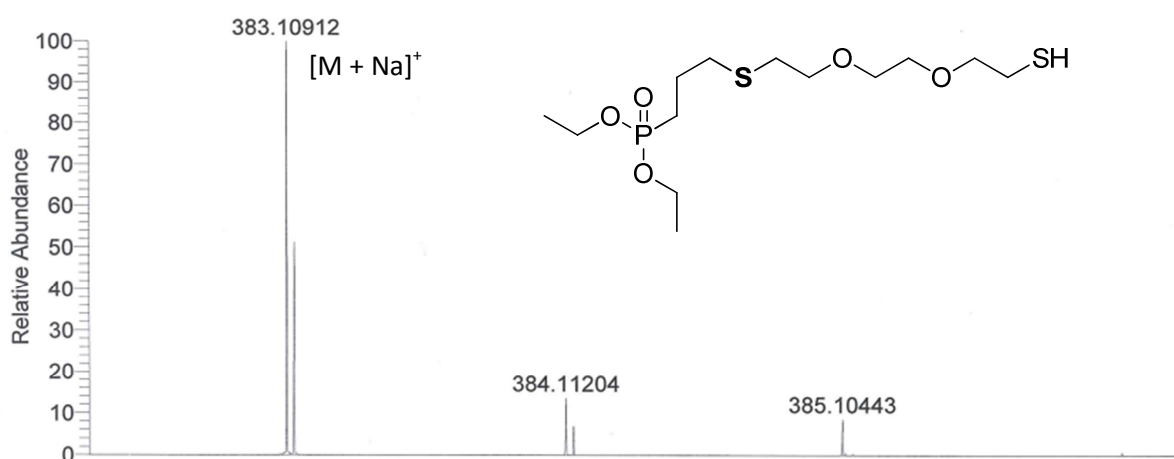
10.4 ESI-Massenspektrometrie



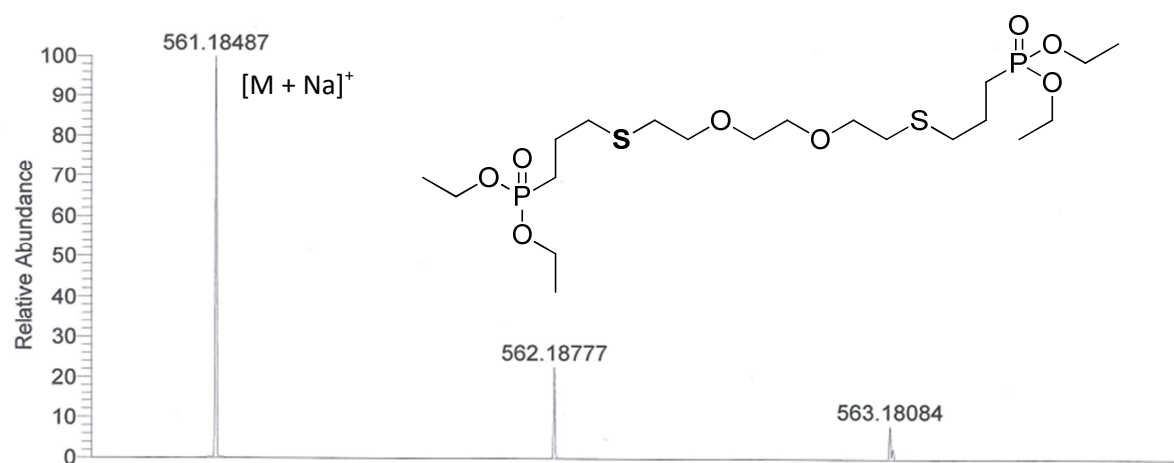
Anhang 10-49 ESI-Massenspektrum von Verbindung 5a.



Anhang 10-50 ESI-Massenspektrum von Verbindung 3a.



Anhang 10-51 ESI-Massenspektrum von Verbindung 5b.



Anhang 10-52 ESI-Massenspektrum von Verbindung **3b**.